



Departamento de Biología, Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid

# **Estudio del gen *Brr2* en la especificación neuronal de *Drosophila melanogaster***

Memoria de Tesis doctoral

**Ignacio Monedero Cobeta**

Directores de Tesis:

**Jonathan Benito Sipos**

**Laura Torroja Fungairiño**

Madrid, Abril de 2014



# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>Fundamentos de la regulación génica en el Desarrollo .....</b>	<b>12</b>
<b>Drosophila melanogaster como modelo de estudio.....</b>	<b>14</b>
<b>Desarrollo embrionario del SNC de <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>14</b>
Generación del patrón anteroposterior y dorsoventral.....	15
Neuroblastos y generación del linaje neural .....	19
Diversidad neural en el linaje de un Neuroblasto .....	22
Integración de información espacial y temporal: adquisición de un destino neuronal.....	25
<b>El Grupo Apterous como modelo de especificación neuronal .....</b>	<b>26</b>
<b>Procesamiento diferencial del ARN en el desarrollo.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>46</b>
Alelos mutantes de <i>Drosophila</i> .....	46
Balanceadores.....	47
Sistemas de expresión dirigida Gal4-UAS y LacZ.....	48
Obtención de líneas en fondo mutante <i>Brr2</i> .....	51

<b>Caracterización genómica del mutante <i>Brr2</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>Inmunodetección de marcadores celulares .....</b>	<b>53</b>
<b>Estudio de los ARNm .....</b>	<b>57</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>1. Caracterización molecular del alelo mutante <i>Brr2</i><sup>09C117</sup> .....</b>	<b>62</b>
<b>2. Identificación de <i>Brr2</i> como determinante de los destinos neuropeptidérgicos FMRFa y Nplp1 en el Grupo Apterous. ....</b>	<b>65</b>
<b>3. Relaciones epistáticas existentes entre <i>Brr2</i> y los componentes del código combinatorio responsable de la especificación del Grupo Apterous. ....</b>	<b>71</b>
3.1 Los componentes tempranos del código combinatorio de especificación del Grupo Apterous no se ven afectados en los mutantes <i>Brr2</i> .....	71
3.2 <i>Brr2</i> es necesario para la correcta expresión de los factores Dimm y pMad, componentes tardíos del código combinatorio de especificación del Grupo Apterous. ....	74
<b>4. Implicación de <i>Brr2</i> en los procesos de axonación y señalización retrógrada vía BMP en Ap4. ....</b>	<b>81</b>
4.1 <i>Brr2</i> es necesario para la correcta inervación del Órgano Neurohemal por parte de la neurona Ap4.....	81
4.2 <i>Brr2</i> es necesario para la correcta expresión y/o activación de los receptores BMP de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$ en Ap4.....	85

<b>5. <i>Brr2</i> como componente del spliceosoma dentro de los mecanismos de diferenciación del grupo Ap .....</b>	<b>88</b>
5.1 Identificación de <i>Prp8</i> y <i>peanuts</i> como determinantes de los destinos neuropeptidérgicos FMRFa y Nplp1 en el Grupo Apterous..	89
5.2 Estudio preliminar de los ARNm de los genes <i>sax</i> , <i>tkv</i> , <i>wit</i> y <i>Nplp1</i> en mutantes <i>Brr2</i> <sup>09C117</sup> .....	93
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>100</b>
<b>1. <i>Brr2</i> en la especificación del Grupo Apterous. ....</b>	<b>101</b>
1.1 Papel de <i>Brr2</i> en la especificación de Ap1 y la expresión de Nplp1 en el Grupo Apterous.....	102
1.2 Papel de <i>Brr2</i> en la especificación de Ap4 y la expresión de FMRFa en el Grupo Apterous .....	104
<b>2. <i>Brr2</i> como regulador post-trancricional en la especificación neuronal.....</b>	<b>110</b>
<b>3. <i>Brr2</i> en la especificación neuronal: factor específico en diferenciación frente a componente general del spliceosoma.....</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>124</b>









## RESUMEN

---

El cerebro humano está formado por más de 10.000 tipos celulares diferentes. Esta diversidad celular comienza a establecerse en el desarrollo embrionario durante el cual, células madre neurales o Neuroblastos dan lugar a células diferenciadas que conformarán los distintos tipos celulares. Utilizando la Cuerda Nerviosa Ventral de *Drosophila* como modelo, el presente trabajo está orientado a profundizar en el conocimiento de los mecanismos que rigen la especificación celular. El estudio realizado está centrado en la función del gen *Brr2* en los procesos de especificación neuronal del Grupo Apterous, un grupo de cuatro neuronas que pertenecen al linaje tardío del Neuroblasto 5-6 y adquieren distintos destinos celulares determinados por la expresión de los genes de diferenciación terminal *FMRFamida* (*FMRFa*) y *Neuropeptide like precursor 1* (*Nplp1*). *Brr2* codifica una proteína del tipo DExD/H-box con actividad helicasa que juega un papel fundamental en el procesamiento del ARN. Aunque no ha sido descrita ninguna relación de *Brr2* con procesos de especificación neuronal, recientemente ha sido relacionado con la expresión de *FMRFamida*. En este trabajo hemos podido determinar que *Brr2* juega un papel fundamental en la especificación de los destinos celulares correspondientes a la expresión de los marcadores *FMRFa* y *Nplp1* específicamente en el Grupo Apterous. Así mismo se ha podido identificar que *Brr2* actúa a dos niveles en la activación de la ruta de señalización retrógrada BMP/TGF- $\beta$  necesaria para la expresión de *FMRFa* en el Grupo Apterous: en los procesos de proyección axonal e inervación a su tejido diana y en la activación de los receptores BMP correspondientes a esta vía. Además, los resultados obtenidos han permitido sugerir que los mecanismos de procesamiento de ARN regulados por *Brr2* están

estrechamente relacionados con la adquisición de los destinos celulares del Grupo Apterous.





## INTRODUCCIÓN

---

La Biología del Desarrollo estudia los procesos que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y la morfogénesis. Estos procesos están orientados a generar la diversidad y la organización celular que constituirá un individuo capaz de reproducirse. De esta forma una única célula, el cigoto, dará lugar a neuronas, células musculares, células sensoriales, osteocitos, linfocitos, etc... Para ello, Las células deben sufrir procesos de proliferación, migración y diferenciación que permitan conformar las estructuras con funciones específicas complejas que constituyen el individuo. Es en la regulación génica de estos procesos que ocurren durante la embriogénesis, donde se centra actualmente el estudio de la Biología del Desarrollo.

### **Fundamentos de la regulación génica en el Desarrollo**

Durante la embriogénesis las células deben dividirse de una forma controlada, a la vez que desarrollan las estructuras propias de la función que deben desempeñar dentro del organismo. Estos procesos están determinados por la precisa regulación espacial y temporal de la expresión génica. Esta regulación génica resulta fundamental para el control de la proliferación, la diferenciación y la morfogénesis, procesos que permiten dar lugar a un individuo a partir de una única célula. Existen numerosos procesos que regulan la expresión de los genes tanto espacial como temporalmente. Uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica son las cascadas de señalización. Cada célula recibe información del entorno extracelular y/o células vecinas a través de receptores de membrana los cuales a su vez, mediante segundos

mensajeros, promoverán la expresión de determinados factores y/o co-factores de transcripción. Se desencadena así la expresión de grupos o baterías de genes, incluyendo otros factores de transcripción, generando así un patrón de expresión organizado que permitirá continuar o no con el ciclo celular, así como desarrollar las características específicas de un tipo celular concreto. Además de factores de transcripción, estos genes codifican, entre otros componentes, enzimas responsables de la condensación/ des-condensación de la cromatina que regulan la disponibilidad de las regiones promotoras de los genes (responsables de los denominados cambios epigenéticos), factores de splicing que permiten el procesamiento de los ARN mensajeros (ARNm) y la expresión de distintas isoformas de las proteínas, o microARNs que interfieren con la traducción de los ARNm. Todos estos mecanismos de regulación génica contribuyen a establecer los patrones de expresión que generan la diversidad celular.

Conocer todos los componentes y mecanismos específicos que rigen estos patrones de expresión es de vital importancia para llegar a entender como una célula totipotencial, como es el cigoto, da lugar a un conjunto de células sumamente especializadas con una identidad muy concreta dentro de un individuo. Resulta obvio el potencial terapéutico de este conocimiento, desde el uso de células madre para la regeneración de tejidos dañados o enfermos, hasta el control del ciclo celular en los procesos de proliferación descontrolados de los más de 200 tipos de cáncer conocidos. En el campo de la Biología del Desarrollo se han utilizado diversos modelos animales que permiten el estudio de las bases genéticas y moleculares de estos procesos, los cuales se encuentran altamente conservados dentro del Reino Animal. Uno de los modelos animales más destacados es *Drosophila melanogaster*.

### **Drosophila melanogaster como modelo de estudio**

También conocida como mosca de la fruta o del vinagre, *Drosophila melanogaster* ha sido utilizada ampliamente como modelo de estudio no sólo en Biología del desarrollo, sino también para el estudio de muchas patologías humanas como Alzheimer, diabetes, estrés oxidativo, etc. El alto grado de conservación de las secuencias codificantes entre *Drosophila* y otros organismos, incluidos los humanos (Adams et al., 2000), junto con la baja complejidad y la relativamente fácil manipulación de su genoma, hacen de este animal un marco de estudio excelente. Otras ventajas son su corto ciclo de vida, ya que desde la fecundación del huevo hasta el individuo adulto transcurren tan sólo 10 días (a 25°C), y el alto número de su progenie en cada generación. Además, debido al uso extendido de *Drosophila* como modelo de estudio, existe una gran variedad de técnicas y herramienta genéticas disponibles que permiten un abordaje experimental excelso. Concretamente, el empleo de este organismo en el estudio del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) ha permitido identificar combinaciones únicas de expresión de genes que determinan y controlan su formación a partir del neuroectodermo (Skeath and Thor, 2003).

### **Desarrollo embrionario del SNC de *Drosophila melanogaster***

El SNC se ha convertido en uno de los escenarios más importantes en la Biología de desarrollo debido a las numerosas neuropatologías existentes y la inexistencia de tratamientos eficaces capaces de prevenir o subsanar el daño que éstas provocan. El cerebro humano, está compuesto por alrededor de 100.000 millones de neuronas divididas en más de 10.000

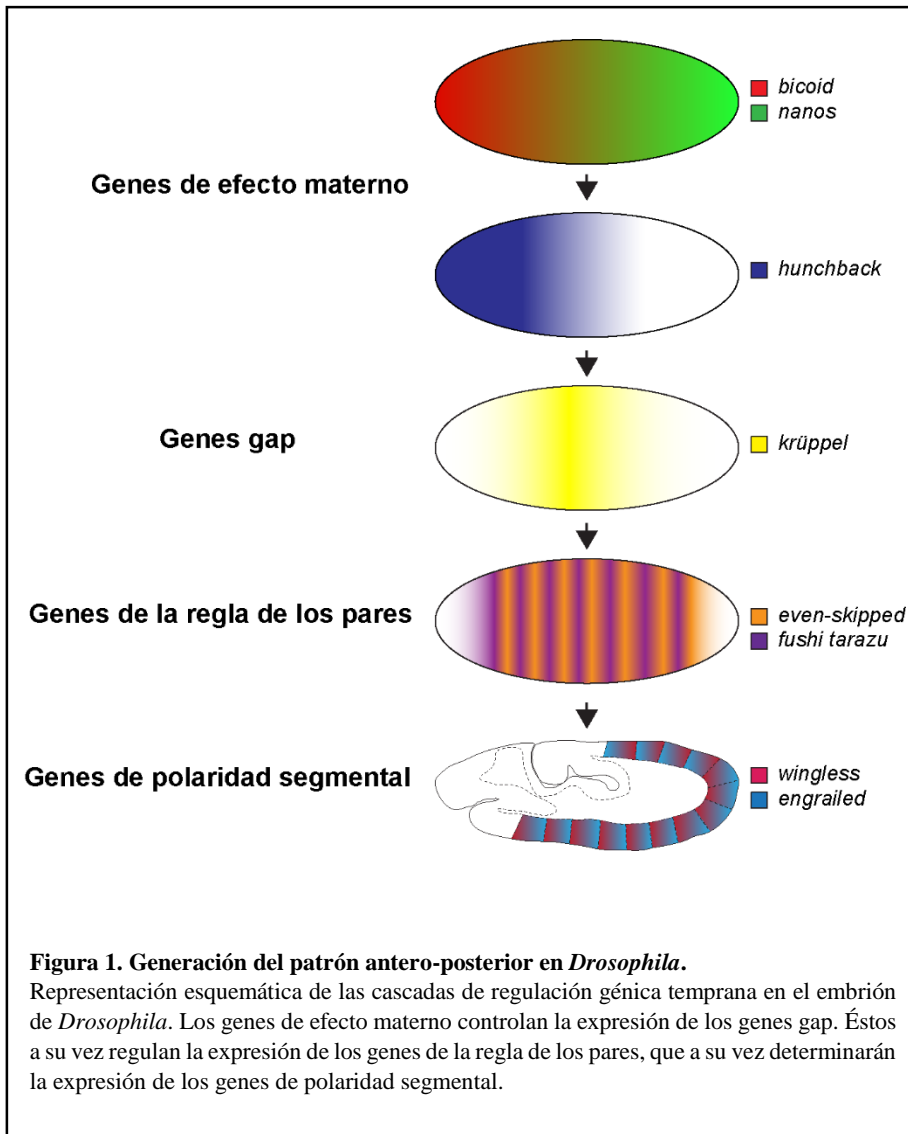
tipos diferentes (Muotri and Gage, 2006). Conocer de forma precisa cómo se genera esta variabilidad podría ayudar en el conocimiento de estos procesos y ahí es donde adquieren importancia los modelos menos complejos como *Drosophila* donde el número de neuronas se reduce a tan sólo 300.000. Además, muchos de los genes que intervienen en el desarrollo del SNC en *Drosophila*, así como las interacciones jerárquicas que existen entre ellos, se conservan en el SNC de vertebrados (Reichert, 2009). El SNC de *Drosophila* está formado por 18 segmentos o neurómeros bien diferenciados: 3 segmentos cefálicos (B1-B3), 3 segmentos subesofágicos (SE1-SE3), tres segmentos torácicos (T1-T3) y 8 segmentos abdominales (A1-A8). Los segmentos torácicos y abdominales conforman la cuerda nerviosa ventral (CNV). La CNV ha sido más utilizada en el estudio del desarrollo debido a su menor complejidad en comparación con el cerebro (Technau et al., 2006).

### **Generación del patrón anteroposterior y dorsoventral**

El desarrollo del SNC de *Drosophila* comienza con la gastrulación y la formación de las tres capas germinales: endodermo, que dará origen a la mayoría de órganos internos; mesodermo que dará origen principalmente a los músculos; y el ectodermo, que dará lugar a la epidermis y al sistema nervioso. Del ectodermo surge una lámina unicelular denominada neuroectodermo caracterizada por la expresión de genes proneurales, factores de transcripción de tipo bHLH (basic Helix-Loop-Helix) como *atonal* y el complejo formado por *achete*, *scute* y *lethal of scute*, que darán lugar a las Células Madre Neurales o Neuroblastos (NB). Los NBs a su vez generarán linajes neurales que adquirirán sus respectivas identidades en función del lugar que ocupen en relación al organismo.

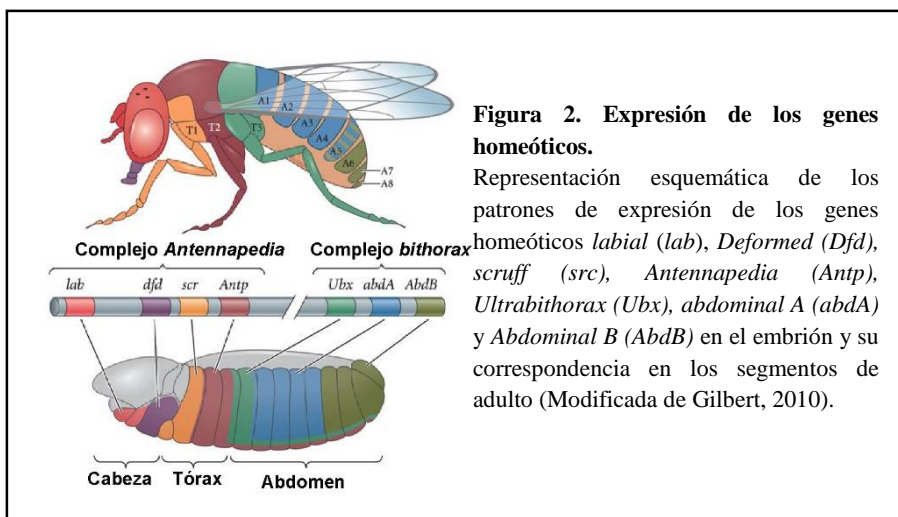


Durante las etapas tempranas del desarrollo se establece en el embrión un eje anteroposterior gracias a la expresión de genes maternos que quedan distribuidos asimétricamente incluso antes de la fertilización del huevo. De este modo el ARNm de genes de efecto materno, como por ejemplo *bicoid* (localizado en la futura parte anterior del embrión), actuará como factor de transcripción del gen *hunchback* (*hb*) generando un gradiente de expresión de éste último. La expresión de *hb* actuará a su vez como factor de transcripción de los genes gap, como *Krüppel* (*Kr*) o *giant* entre otros. Siguiendo con el ejemplo, altas o muy bajas concentraciones de *hb* inhiben la expresión de *Kr*, que se limitará a la zona central del embrión (Fig.1). A su vez los genes gap actuarán como factores de transcripción de los genes de la regla de los pares, como *even-skipped* y *fushi tarazu*, que se expresan a lo largo del eje anteroposterior de forma alterna, definiendo 14 segmentos en el embrión. De esta forma, la acción de los genes maternos, los genes gap y los genes de la regla de los pares regulará a su vez la expresión de los genes de polaridad segmental como *wingless* y *engrailed*, que definen la división en el eje anteroposterior en cada segmento (Akam, 1987; Lawrence et al., 1996; Skeath and Thor, 2003; Technau et al., 2006). Además del eje anteroposterior, se genera un eje dorso-ventral debido al gradiente establecido por la expresión de los genes *twist*, *rhomboid* y *sog* que a su vez controlaran la expresión de los genes columnares (McDonald et al., 1998). De esta manera se definen las diferentes capas embrionarias que determinarán el proceso de organogénesis.



Estos mecanismos complejos que definen los ejes anteroposterior y dorsoventral, establecen una precisa red de coordenadas en fases tempranas del desarrollo. En el caso del neuroectodermo, la lámina unicelular queda codificada de forma precisa de modo que las células expresan los factores de transcripción correspondientes a la posición que ocupan en esta red cartesiana. La información espacial generada en el

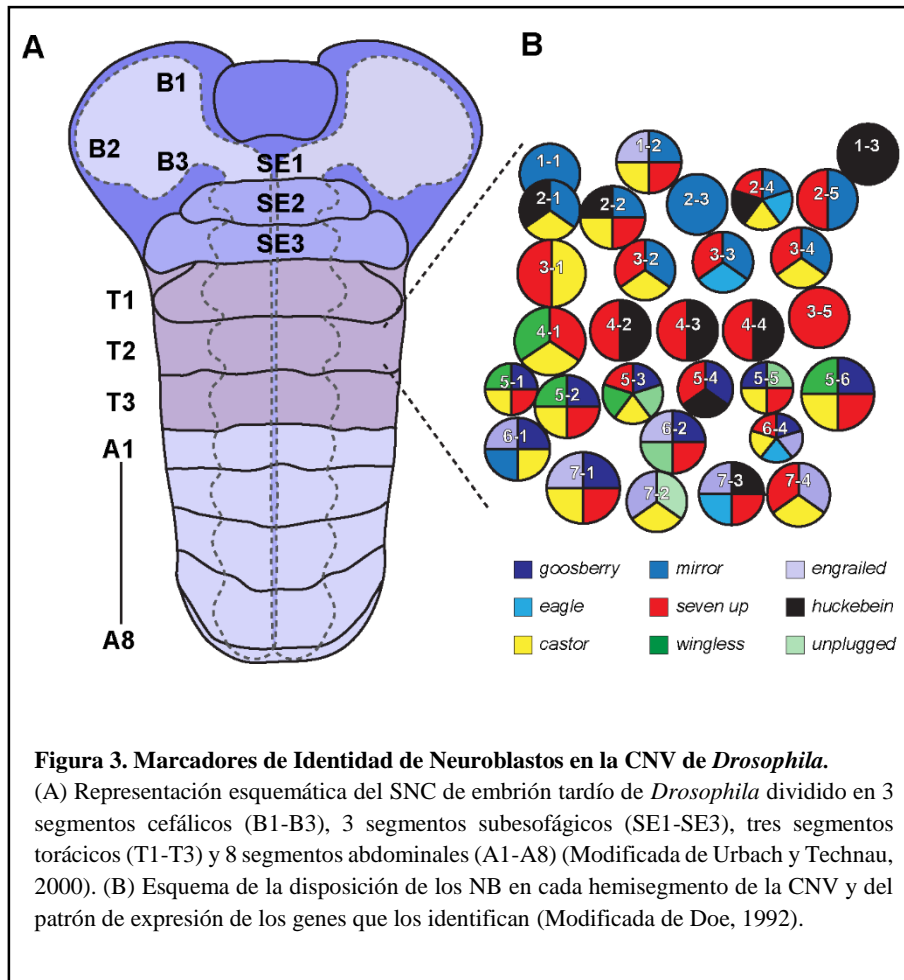
neuroectodermo por la expresión de los genes de polaridad segmental y los columnares define en cada hemineurómero grupos de 5 o 6 células con la misma identidad o potencialidad. Estos grupos de células se denominan “grupos de equivalencia neural”. No obstante los distintos segmentos estarán destinados a una función concreta en el individuo y por tanto los grupos de equivalencia neural definidos en cada hemisegmento son homólogos pero no idénticos. Las características diferenciales de cada uno deberán especificarse, en función del tagma que vayan a ocupar, por la acción de los genes Homeóticos o genes Hox, que terminan de definir el patrón anteroposterior. Los genes Homeóticos se encuentran muy conservados y establecen el patrón corporal de todos los animales pluricelulares. En *Drosophila* se han descrito dos grupos de genes Hox englobados en los complejos *Antennapedia* y *bithorax* que determinaran la identidad de los segmentos cefálicos, torácicos y abdominales (Fig.2) (Hirth et al., 1998).



## Neuroblastos y generación del linaje neural

Los NB se diferencian a partir de los grupos de equivalencia neural. De estos grupos de 5 o 6 células tan sólo una de ellas será especificada como Neuroblasto (NB), el resto se diferenciará en células de la epidermis o permanecerán indiferenciadas. Esta selección del NB se produce por la acción de los genes proneurales y a la ruta de señalización de Notch. Los genes proneurales, principalmente el complejo formado por *achete*, *scute* y *lethal of scute (ac/sc)*, son capaces de activar la ruta de Notch en las células. A su vez la activación de la ruta de Notch, reprime la expresión del complejo *ac/sc*. De esta forma se establece una competencia entre las células del grupo de equivalencia neural donde la célula que tenga mayores niveles de expresión de *ac/sc* o menor actividad en la ruta de Notch, se especificará en NB y producirá un efecto de inhibición lateral, impidiendo la especificación de las restantes (Skeath and Thor, 2003). Una vez especificados los NBs de cada grupo de equivalencia neural, estos migran hacia el interior del embrión secuencialmente en 5 olas de delaminación. Como resultado, cada hemineurómero de la CNV estará formado por 30 NBs ordenados en 7 filas y 6 columnas cada uno con su propia identidad definida (Fig. 3) (Bhat, 1999; Doe and Technau, 1993; Skeath, 1999).

Cada NB, después de la delaminación, genera un linaje único mediante varias rondas de división asimétrica generando, en cada ronda, dos células con distinta identidad. Una de ellas mantiene su identidad de NB, dividiéndose asimétricamente y autorenovándose; la otra, más pequeña, denominada Célula Madre Ganglionar (CMG), se dividirá una última vez, también de forma asimétrica, para generar dos células que podrán ser neurona, célula de la glía y/o célula destinada a muerte celular programada (apoptosis) (Chia and Yang, 2002).

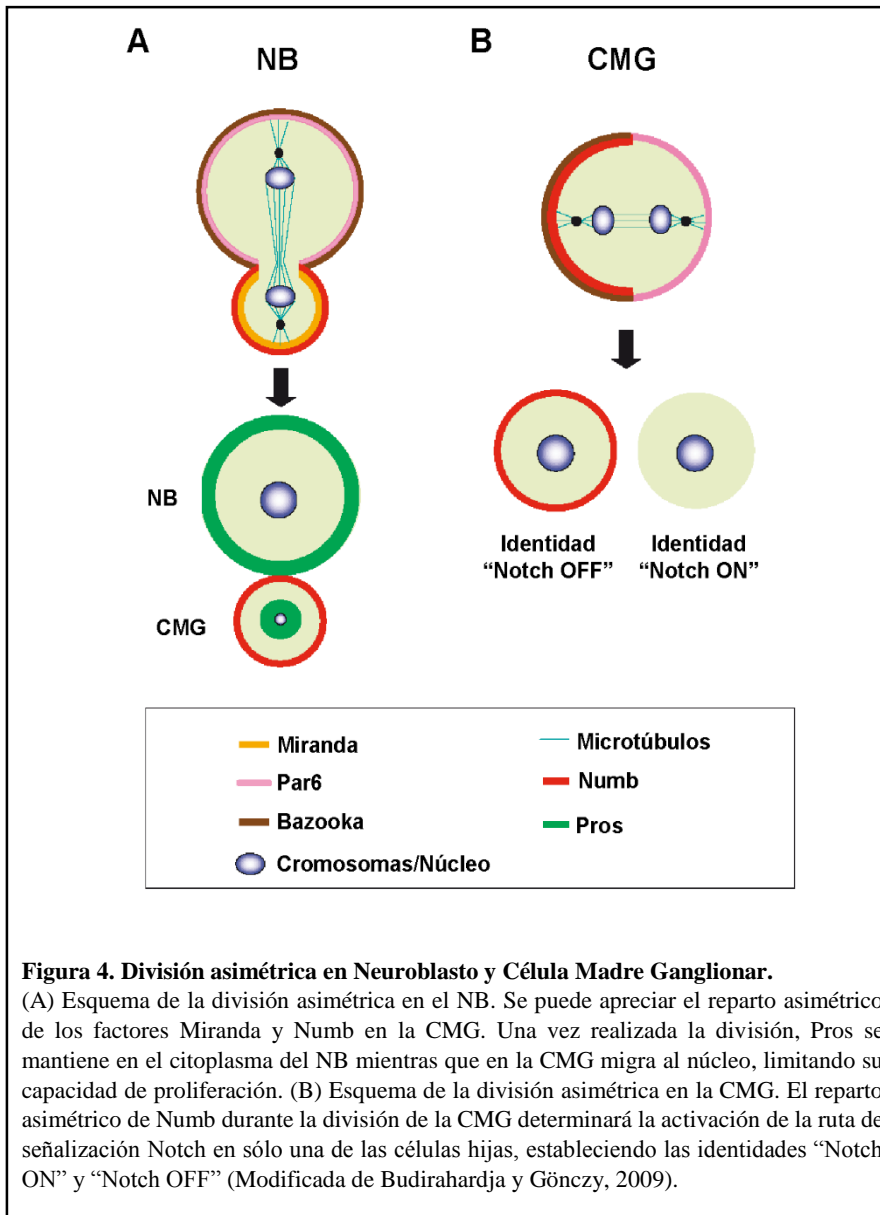


Durante la división asimétrica del NB que da lugar a la CMG, resulta fundamental el reparto asimétrico (apical/basal) de distintas proteínas como Bazooka, Par6, Prospero (Pros) o Miranda. Bazooka se localiza en la zona apical, uniéndose a lípidos de la membrana y reclutando otras proteínas como Par6 y la proteína QuinasaC. Este complejo fosforila a Prospero (Pros) y Miranda, un factor de transcripción y su adaptador, que una vez fosforilados migran y se sitúan en posición basal. La distribución desigual de Pros resulta determinante en la división asimétrica del NB (Skeath and Thor, 2003). Una vez concluida la división, Pros, situado

ahora en la CMG, será el responsable de que exista una única división en la CMG mediante su translocación al núcleo, provocando la salida del ciclo celular. Durante todo el proceso de división resulta de vital importancia la correcta formación y orientación del huso mitótico (Wang and Chia, 2005).

En el caso de la división asimétrica de la CMG la ruta de señalización Notch determina las distintas identidades de las células hijas. En este caso, durante la mitosis de la CMG es la proteína Numb, junto con su adaptador Pon, las que se distribuyen de forma asimétrica estando presentes en una de las células hijas (Doe and Bowerman, 2001). Numb actúa como represor de la ruta Notch generando dos identidades conocidas como “Notch ON” y “Notch Off” en función de si está activa la señalización (Cau and Blader, 2009). Tanto el destino “Notch ON”(A) como el “Notch OFF” (B) pueden especificar destino de neurona, glía o muerte celular programada dependiendo del contexto celular del linaje; no obstante cada una de las células resultantes de la división de una misma CMG tendrán identidades distintas entre sí (Fig.4).

Este patrón de división descrito, NB/CMG/A-B, es el mayoritario en la CNV. No obstante se ha descrito que algunos NBs de la CNV, como el NB 5-6 torácico y el NB 7-3, alteran este patrón en sus últimas divisiones, de tal manera que la división asimétrica del NB no genera una CMG intermediaria, sino directamente una neurona (Baumgardt et al., 2009; Karcavich and Doe, 2005).



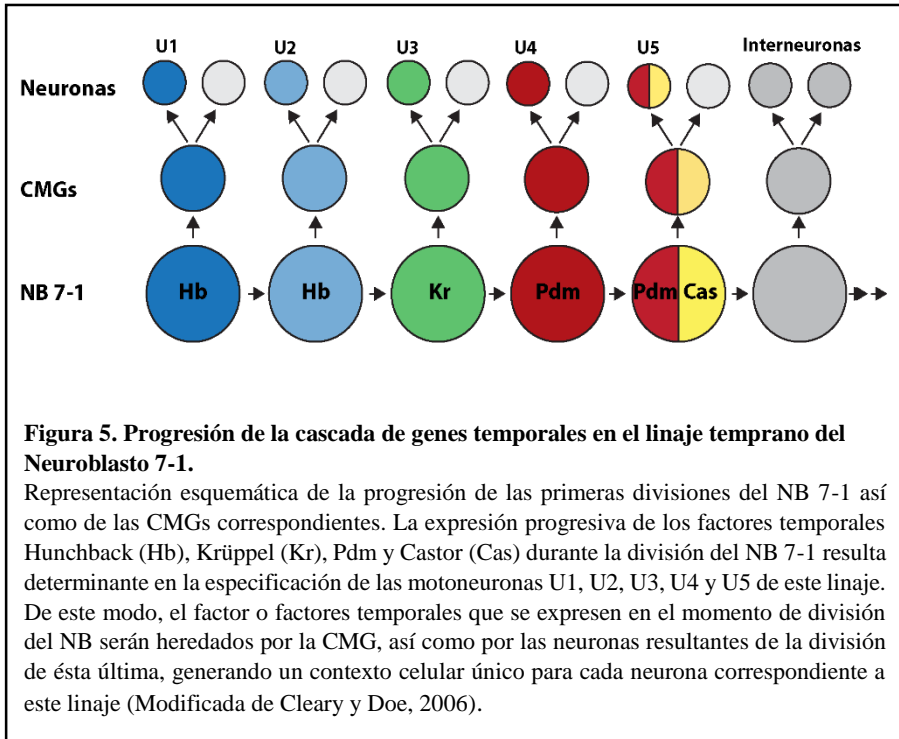
### Diversidad neural en el linaje de un Neuroblasto

Aparte de la diversidad generada por la identidad espacial definida por la ubicación de los NBs en las coordenadas establecidas en cada hemisegmento, las sucesivas rondas de división de los NB durante la

progresión del linaje añaden un nuevo componente a la diversidad neural, el tiempo. La expresión secuencial de factores de transcripción durante las divisiones del NB conocida como “cascada de genes temporales” otorgan identidad al NB, a la CMG y a sus células hijas según la ronda de división en la que se generen (Pearson and Doe, 2004). Los genes correspondientes a estos factores de transcripción temporales han sido descritos, siguiendo esta misma secuencia temporal de expresión, como *hunchback* (*hb*), *krüppel* (*kr*), *pdm1* (*pdm*), *castor* (*cas*) y *grainyhead* (*grh*). Cada uno de estos factores regula a los adyacentes, permitiendo el progreso preciso de esta cascada temporal *hb>kr>pdm>cas>grh*. La expresión de cada factor temporal, o combinaciones de más de uno de ellos, genera una ventana temporal que determinará la identidad de las células nacidas en un determinado momento (Baumgardt et al., 2009; Karcavich and Doe, 2005; Maurange et al., 2008; Pearson and Doe, 2004; Thor, 2013; Tran and Doe, 2008). El papel de los genes temporales en la generación de diversidad neuronal ha sido muy estudiado en varios linajes de NBs. Uno particularmente bien estudiado es el correspondiente al NB7-1 (Fig.5) (Cleary and Doe, 2006). Este NB genera alrededor de 20 CMG y las 5 primeras generan a su vez 5 motoneuronas denominadas U1 a U5 según el orden de nacimiento. Cada una de estas motoneuronas tiene una identidad distinta expresando una combinación de factores, proyección axonal y posición únicas. Las CMG precursoras de cada motoneurona nacen durante ventanas temporales definidas por los niveles de expresión de los genes temporales: altos niveles de *hb* (U1); bajos niveles de *hb* y de *kr* (U2); altos niveles de *kr* (U3); *pdm* (U4); co-expresión de *pdm* y *cas* (U5). Estas ventanas temporales son necesarias y suficientes para determinar la identidad de estas motoneuronas de modo que mutantes en cada uno de estos factores provocan la pérdida de la correspondiente identidad. De



igual modo, se ha descrito que la expresión dirigida de *hb*, ampliando su ventana temporal, induce la especificación de hasta 15 neuronas del linaje del NB 7-1 en motoneuronas U1 (Cleary and Doe, 2006).



También se han descrito factores “subtemporales” capaces de subdividir a su vez ventanas temporales largas. Los factores subtemporales se caracterizan por estar regulados por los factores temporales y su expresión se limita a grupos de NBs restringidos, actuando como determinantes de destinos celulares concretos. Los genes subtemporales como *squeeze (sqz)* y *nab*, regulados por *cas*, y *seven up (svp)*, regulado por *cas* y *grh*, subdividen la ventana temporal de *cas/grh* en el NB5-6, contribuyendo al establecimiento de la identidad celular del linaje tardío del NB 5-6. (Baumgardt et al., 2009; Benito-Sipos et al., 2011).

## **Integración de información espacial y temporal: adquisición de un destino neuronal**

La especificación final de una neurona viene determinada por la activación postmitótica de distintas baterías de genes que conferirán propiedades únicas tales como morfología, expresión de neurotransmisores, receptores, axonación, etc. Los genes cuya expresión caracteriza y define un tipo neuronal concreto se denominan “genes de diferenciación terminal”. Según el modelo más reciente, el conjunto de factores espaciales y temporales antes descritos heredados durante el desarrollo y únicos en cada neurona, activan un código combinatorio de reguladores transcripcionales que a su vez promueve la expresión de un grupo específico de genes de diferenciación terminal. La integración de los distintos factores espaciales y temporales definidos por los precursores neurales de cada neurona genera un contexto celular único, activando los códigos combinatorios específicos para un destino celular (Baumgardt et al., 2007, 2009).

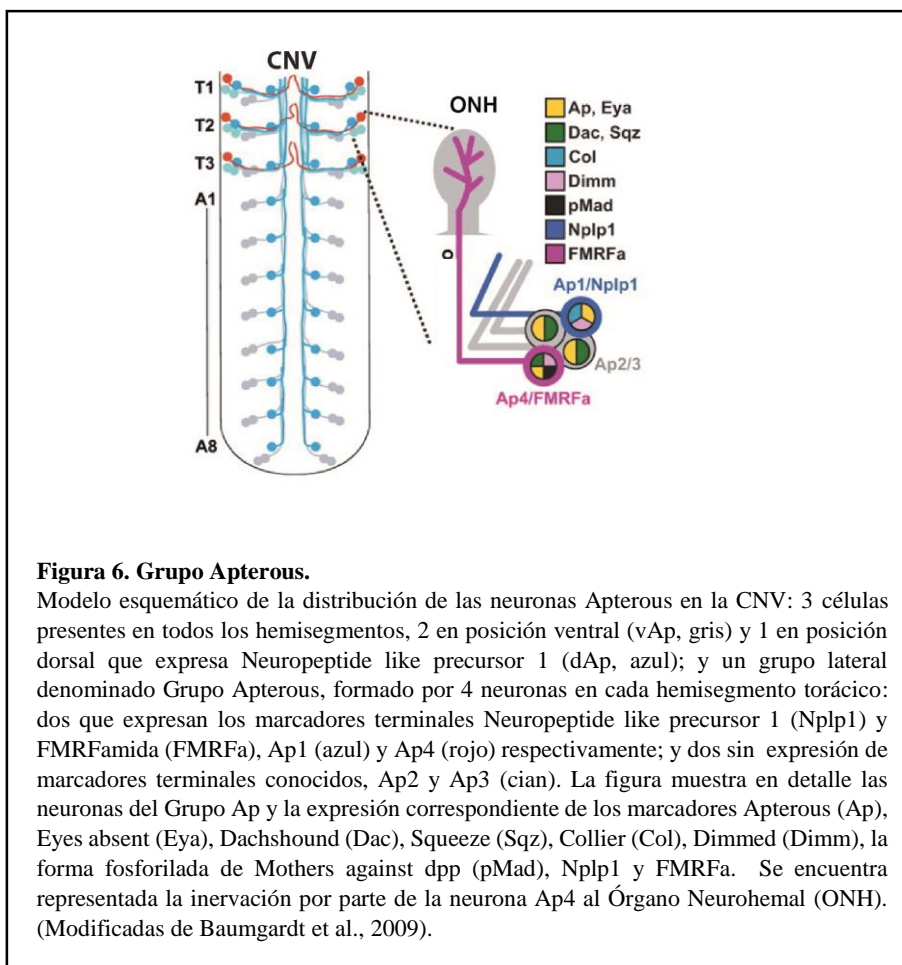
Además de los factores intrínsecos de cada neurona, se ha descrito que algunas neuronas necesitan de factores extrínsecos que determinan o modifican la expresión de los genes de diferenciación terminal. Principalmente estas señales tienen su origen en las células o tejidos diana de modo que la liberación paracrina de diversos ligandos activa rutas de señalización como BMP (“Bones Mophogenetic Protein”) o EGF (“Epidermal Growth Factor”) que contribuyen a modular o activar la expresión de genes de diferenciación terminal (Allan et al., 2003; Edlund and Jessell, 1999; Hippenmeyer et al., 2004).

Uno de los destinos neuronales más utilizados para el estudio de la especificación neuronal y por tanto, de los códigos combinatorios de factores de transcripción y de las señales extrínsecas que regulan la expresión de los genes de diferenciación terminal, son los destinos

neuropeptidérgicos. Los neuropéptidos tienen patrones de expresión muy restringidos y fácilmente reconocibles. Por ejemplo, la FMRFa (FMRFa) tiene restringido su patrón de expresión a tan sólo 6 neuronas en toda la CNV (Taghert, 1999). Otros neuropéptidos como Neuropeptide like precursor 1 (Nplp1), Capability (Capa) o Leucoquinina (Lk) tienen patrones igualmente restringidos e identificables. Esto ha permitido y fomentado el uso de los neuropéptidos como marcadores de diferenciación terminal en el estudio de los mecanismos, tanto intrínsecos como extrínsecos, que rigen la especificación neuronal. (Allan et al., 2003, 2005; Baumgardt et al., 2007, 2009; Benito-Sipos et al., 2010, 2011; Gabilondo et al., 2011; Keshishian and Kim, 2004; Losada-Pérez et al., 2010; Miguel-Aliaga et al., 2004).

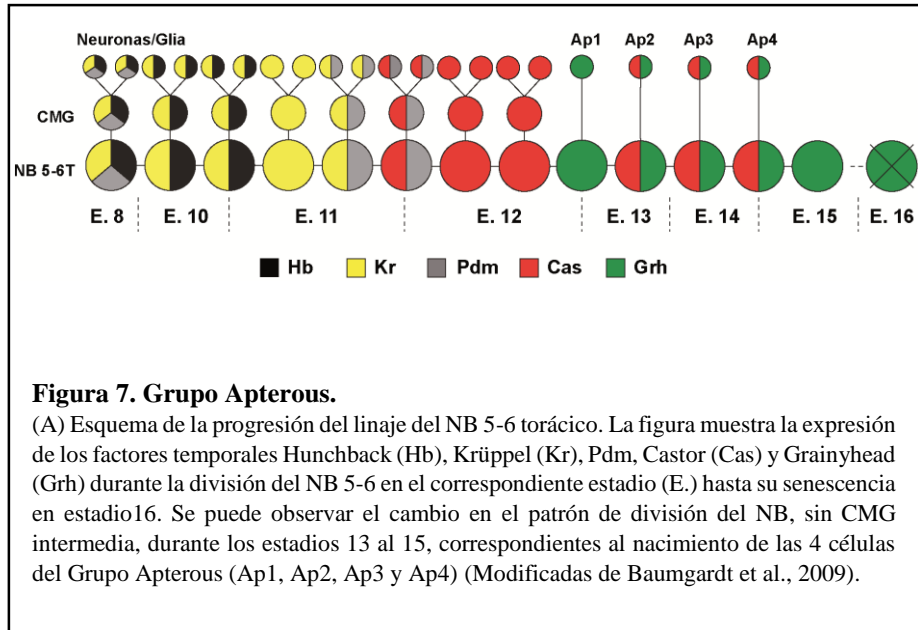
### **El Grupo Apterous como modelo de especificación neuronal**

Las neuronas Apterous se definen por expresar el factor de tipo LIM-Homeodominio Apterous (Ap). En la CNV, estas neuronas tienen un patrón de expresión muy claro y reconocible: un grupo lateral denominado Grupo Apterous, formado por 4 neuronas en cada hemisegmento torácico denominadas Ap1, Ap2, Ap3 y Ap4; y 3 células presentes en todos los hemisegmentos de la CNV (Fig.6), 2 en posición ventral (vAp) y 1 en posición dorsal (dAp) (Taghert, 1999). Las cuatro neuronas del Grupo Ap tienen como origen el mismo NB, el NB 5-6 torácico (NB5-6T), y han sido descritos dos neuropéptidos expresados en estas neuronas que se han utilizado como marcadores de diferenciación terminal en estas neuronas, Nplp1 expresado en Ap1 y FMRFa expresado en Ap4 (Baumgardt et al., 2007). Para el destino celular de Ap2 y Ap3 aún no se han descrito marcadores terminales. Estas características hacen del Grupo Ap un excelente marco para el estudio de la diferenciación celular.



Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario el NB 5-6T se divide de forma canónica (NB/CMG/A-B). A partir del estadio 12 embrionario el NB 5-6T modifica su patrón de división de modo que el NB se divide de forma asimétrica pero directamente da lugar a una neurona sin que aparezca una CMG intermediaria. Este cambio en el patrón de división se debe a la activación de la ruta de señalización de Notch en el neuroblasto durante dicho estadio (Ulvklo et al., 2012) . Este ciclo atípico de división se produce durante los últimos 4 ciclos del NB 5-6T, antes de que éste entre en senescencia y muera en el estadio 16 embrionario. Las 4 neuronas

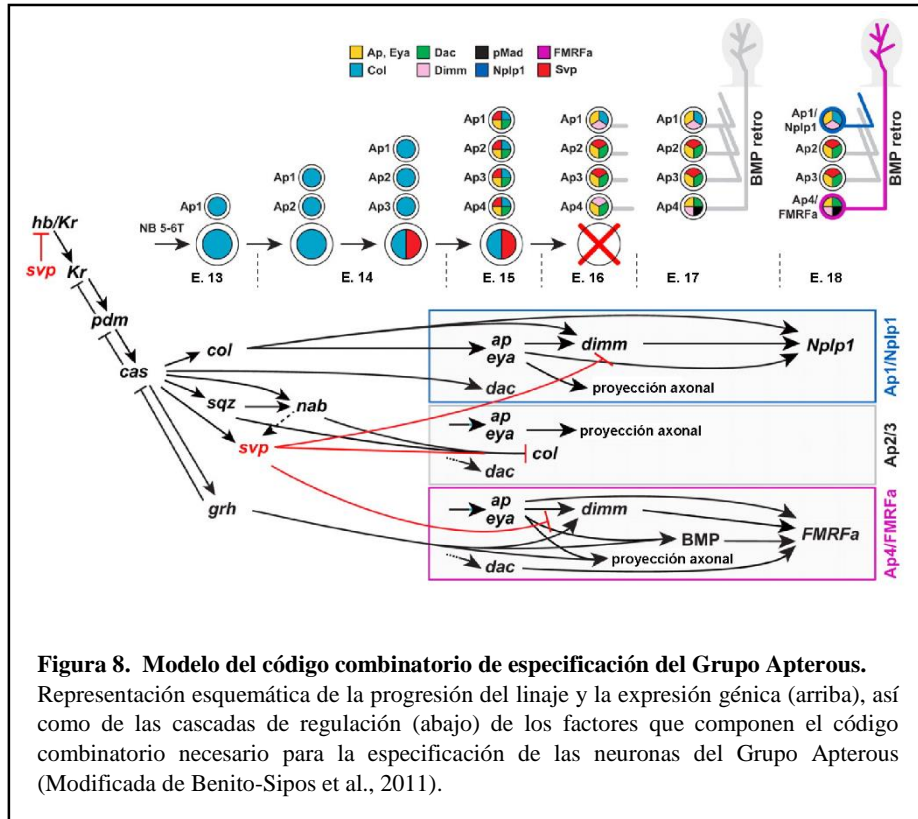
resultantes de estos últimos ciclos de división del NB 5-6T son las neuronas del Grupo Ap (Fig.6).



Se han realizado estudios en el linaje del NB5-6T identificando los factores temporales que expresa el NB en cada momento, las ventanas temporales correspondientes al nacimiento de las neuronas del Grupo Ap, así como muchos de los factores de transcripción que forman parte del código combinatorio que éstos desencadenan para su especificación. Las neuronas del Grupo Ap nacen en una ventana temporal mixta correspondiente a la expresión de los factores Castor (Cas) y Grainyhead (Grh). Cas juega un papel fundamental en la especificación de los destinos neuronales del Grupo Ap mediante la activación simultánea de tres cascadas de señalización paralelas que siguen un patrón temporal específico y generan contextos celulares únicos en cada neurona Ap (Fig.8)(Baumgardt et al., 2009; Kohwi and Doe, 2009). Por un lado Cas

activa la expresión del factor de transcripción Collier (Col) que a su vez activa la expresión de los factores Apterous (Ap) y Eyes absent (Eya), ambos presentes en las 4 neuronas del Grupo Ap. La expresión de Ap y de Eya a su vez activa la expresión de Dimmed (Dimm), un factor de transcripción bHLH común a todas las neuronas neuropeptidérgicas. La presencia de Col, Ap, Eya y Dimm resulta necesaria para la especificación de Ap1 y la expresión de Nplp1 y del receptor de dopamina DopR en esta neurona (Baumgardt et al., 2007, 2009). En segundo lugar, Cas activa la expresión de *squeeze* (*sqz*) y *nab*, que codifican un factor de transcripción con dominio del tipo dedos de zinc (Sqz) y el cofactor asociado a él (Nab). Este complejo Sqz-Nab actúa como represor inhibiendo la expresión de *col*. La precisa coordinación temporal de ambas cascadas limita la expresión de *col* a Ap1 y por tanto la expresión del neuropéptido Nplp1, estableciendo su destino celular (Baumgardt et al., 2009). La identidad neuronal de las células Ap2 y Ap3 resulta aún desconocida. Se ha descrito que estas células mantienen la expresión de *ap* y *eya*, así como la presencia del complejo Sqz-Nab, que reprime la expresión de *col* junto con el factor Seven up (Svp) que además inhibe la expresión de *dimm* en Ap2 y Ap3 (Benito-Sipos et al., 2011). Por último Cas promueve la expresión de *grh*, que codifica el otro factor temporal con el que comparte ventana temporal. El factor Grh juega un doble papel. Por un lado actúa como represor de *cas* y por otro, junto con *eya*, promueve la proyección axonal de la neurona Ap4 al Órgano Neurohemal (ONH), diana de esta neurona (Miguel-Aliaga et al., 2004). El ONH por medio de señalización retrógrada vía TGF- $\beta$ /BMP (que se describirá más adelante) induce la fosforilación de la proteína Mad (Mothers against dpp) que se desplazará al núcleo de Ap4, actuando como factor de transcripción. La correcta expresión de *grh*, *ap*, *eya*, *sqz*, *nab* así como la presencia de la forma fosforilada de Mad (pMad)

resulta necesaria para la especificación de Ap4 y la expresión del neuropéptido FMRFa, marcador de diferenciación terminal de Ap4 (Fig.8) (Allan et al., 2003, 2005; Baumgardt et al., 2007, 2009).

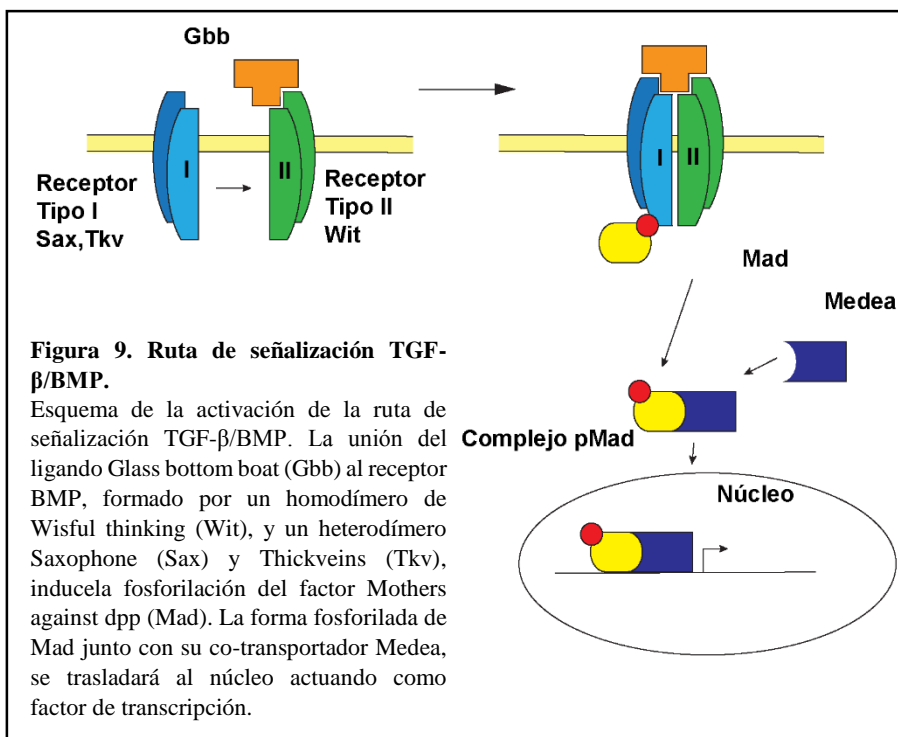


En cuanto a las señales extrínsecas que contribuyen a la especificación de las neuronas del Grupo Ap, diversos estudios han permitido identificar la importancia de la señalización retrógrada vía TGF- $\beta$ /BMP por parte del ONH para la neurona Ap4. Esta señalización comienza con la liberación paracrina por parte del ONH del ligando Glass bottom boat (Gbb). La activación de la ruta BMP se realiza mediante la unión del ligando Gbb al heterotetrámero que constituye el complejo receptor correspondiente formado por 2 tipos distintos de receptores BMP. Un homodímero del receptor BMP tipo II, codificado por el gen *wisful thinking* (*wit*), recluta a

un heterodímero del receptor BMP tipo I, codificado por los genes *saxophone* (*sax*) y *thickveins* (*tkv*). Los receptores BMP tipo I fosforilan al factor citoplasmático Mad (también denominado Smad) que se asocia con el co-factor Medea (proteína co-Smad). El complejo pMad migrará al núcleo y actuará como regulador transcripcional (Fig.8)(Keshishian and Kim, 2004). Mutantes nulos *gbb*, *wit*, y genes implicados en el transporte retrógrado de pMad resultan en la ausencia de expresión de *FMRFa* (Allan et al., 2003; Marqués et al., 2003).

La regulación de la especificación del Grupo Ap, y en concreto de la expresión de los genes de diferenciación terminal *Nplp1* y *FMRFa*, tal y como se ha descrito hasta ahora, ha sido extensamente estudiada. Se han descrito multitud de factores temporales y espaciales, factores que forman parte del código combinatorio específico de estas neuronas y parte de las señales extrínsecas necesarias para su correcta especificación. Estos códigos combinatorios han resultado ser altamente específicos para un destino celular concreto. Estudios realizados mediante la expresión ectópica conjunta de *col* y *ap* han revelado que ambos activan de forma significativa la expresión tanto de *dimm* como la presencia de *Nplp1* en determinados grupos celulares distintos del Grupo Ap (Baumgardt et al., 2007). Del mismo modo, en este mismo estudio se ha podido comprobar que la expresión ectópica de este mismo código utilizando *dachshund* (*dac*) en lugar *col*, resulta en la expresión de *FMRFa* en lugar de *Nplp1*. Por otro lado, la triple expresión ectópica de *ap*, formas constitutivamente activas de los receptores BMP *sax* y *tkv*, y *dac*, activan la expresión de *FMRFa* en la mayoría de las neuronas neuropeptidérgicas (Miguel-Aliaga et al., 2004).





Recientes estudios se han centrado en la búsqueda de nuevos componentes, tanto referentes a señales intrínsecas que determinan el contexto celular, como señales extrínsecas necesarias para la especificación de estos destinos. Uno de estos estudios realizado en *Drosophila*, focalizado en la búsqueda de nuevos determinantes para la expresión de FMRFa mediante mutagénesis química con etilmetanosulfonato (EMS), ha podido revelar 9781 líneas mutantes que presentan defectos en la expresión de FMRFa (Ulvklo et al., 2012). Como parte del estudio de estas líneas, nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio de Stefan Thor (Departamento de Clínica y Medicina Experimental de la Universidad de Linköping), pudo identificar el gen *Brr2*, que codifica una ribonucleoproteína

componente del spliceosoma y presenta defectos en la expresión de *FMRFa*.

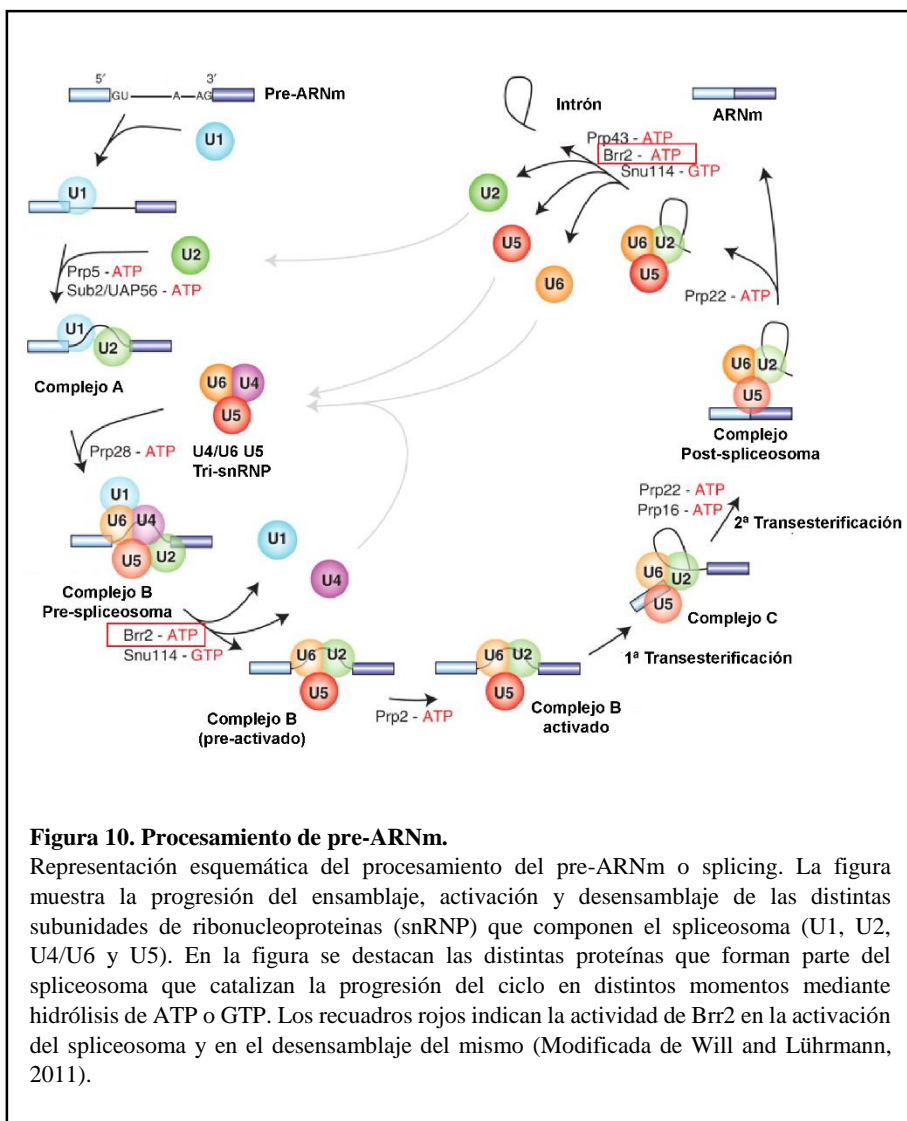
### **El gen *Brr2* y el procesamiento del ARN**

El gen *Brr2* codifica una ribonucleoproteína del tipo snRNP (small ribonucleoprotein). Cada una de las proteínas de esta familia contiene uno de los 5 ARN nucleares (snRNAs) denominados U1, U2, U4, U5 o U6, y se encuentran asociadas a otras proteínas conformando las distintas subunidades que componen el spliceosoma, responsable del procesamiento del ARN (splicing). *Brr2* es una proteína del tipo DExD/H Box ATPasa con actividad helicasa que forma parte de la subunidad U5 y juega un papel fundamental durante el procesamiento del ARN (Staley and Guthrie, 1998).

El splicing es un proceso post-transcripcional por el cual se eliminan los intrones del transcrito primario y posteriormente se unen los exones, permitiendo la correcta codificación de las proteínas. Además, muchos genes son capaces de generar varias isoformas mediante la inclusión de unos u otros exones en el ARN mensajero (ARNm) por medio de la regulación de los mecanismos de splicing (splicing alternativo). Alrededor del 60% de los genes humanos sufren procesos de splicing alternativo, especialmente en genes propios del sistema nervioso, incrementando la diversidad neuronal (Dredge et al., 2001; Grabowski and Black, 2001).

El mecanismo por el cual se ensamblan las distintas subunidades que componen el spliceosoma y por el cual se produce el splicing ha sido

descrito en detalle y está muy conservado en la evolución (Abdelhaleem, 2005; Staley and Guthrie, 1998; Will and Lührmann, 2011). El procesamiento del ARN parte del reconocimiento de tres secuencias específicas: un par Guanina-Uracilo (GU) situado en el extremo 5' del intrón (sitio de corte 5'), un par Adenina-Guanina (AG) en el extremo 3' del intrón (sitio de corte 3') y una Adenina (A; sitio de formación del lazo) situada entre ambas secuencias a 14-40 nucleótidos, dependiendo de la longitud del intrón, del sitio de corte 3' (Fig.10). En un primer paso la subunidad U1 reconocerá la secuencia GU y la subunidad U2 reconocerá la secuencia A y U1 y U2 se asocian entre sí (complejo A). Posteriormente el complejo formado por las subunidades U4/U6 y la subunidad U5 es reclutado por las subunidades U1 y U2 formando el pre-spliceosoma (complejo B). La activación del pre-spliceosoma desencadena la primera reacción de transesterificación, que libera el extremo 5' del intrón del transcrito primario formando la estructura característica de lazo. Es en esta activación catalítica donde Brr2 juega un papel fundamental separando el complejo U4/U6 mediante su actividad helicasa (Mozaffari-Jovin et al., 2013), que junto con la liberación de la subunidad U1 activa el spliceosoma. El nuevo complejo formado por las subunidades U2, U6 y U5 (complejo C), realizará la segunda reacción de transesterificación uniendo los dos exones y liberando el complejo C junto con el intrón. Finalmente este complejo se desensambla preparándose para un nuevo ciclo. Durante el desensamblaje, Brr2 actúa mediante su actividad helicasa separando las subunidades U6 y U2 (Small et al., 2006).



Mutaciones en *Brr2*, concretamente en el homólogo *Brr2p* de humanos, así como defectos en su regulación, están estrechamente relacionados y han sido descritos como causantes de la retinosis pigmentaria (RP) (Hahn and Beggs, 2010; Zhao et al., 2009). Principalmente la regulación de *Brr2* está determinada por dos proteínas que forman también parte de la subunidad U5, Prp8 (pre-mRNA processing factor 8) y Snu114. Snu114 es una proteína del tipo GTPasa que mantiene reprimida la actividad helicasa

de Brr2, mientras que cuando se encuentra unida a GTP la promueve (Small et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que el extremo C-terminal de Prp8 promueve la actividad helicasa de Brr2 *in vitro* a la vez que suprime su actividad ATPasa (Maeder et al., 2009).

### **Procesamiento diferencial del ARN en el desarrollo**

No se han realizado estudios en relación a la posible implicación de *Brr2* en los procesos de especificación neuronal, no obstante, sí existen evidencias del papel fundamental que juegan los mecanismos de splicing alternativo en la Biología del Desarrollo (Lopez, 1998; Salomonis et al., 2010; Spletter and Schnorrer, 2014; Venables et al., 2012; Woodley and Valcárcel, 2002). Los mecanismos de splicing alternativo no sólo generan diversidad de proteínas mediante la generación de distintas isoformas, sino que además son potentes elementos reguladores. Pueden determinar la expresión (o ausencia de expresión) de distintas isoformas según el tipo celular, tisular o incluso a nivel de individuo, estableciendo patrones de expresión y/o procesamiento específicos de diversas baterías de genes.

Uno de los ejemplos que mejor ilustran la importancia de los mecanismos de splicing en el desarrollo es la determinación del sexo en *Drosophila*. En fases tempranas del desarrollo en *Drosophila* se ha descrito que la regulación post-transcripcional mediada por el gen *Sex-lethal* (*Sxl*), que se expresa solo en hembras, inhibe los patrones de splicing que conducen al desarrollo de macho. Slx se une al ARN correspondiente del gen *Transformer* (*Tra*) que codifica otro factor de splicing específico de hembras, de modo que, en ausencia de Slx, el patrón de splicing produce una forma truncada de Tra. La presencia o ausencia de Tra determinara el patrón de splicing, entre otros, de *doublesex* (*dsx*) que en presencia de Tra

incluye un exón específico de hembras en lugar del exón incluido por defecto en machos. El ARNm de *dsx* (tanto el propio de machos como el de hembras) activará la expresión de una batería de genes relacionados con dimorfismo sexual, que a su vez regulan estructuras y comportamientos característicos en macho y hembra (Salz and Erickson, 2010).

Otro ejemplo bien estudiado de la importancia de los procesos de splicing en el desarrollo es el relativo al el gen *embryonic lethal abnormal vision* (*elav*) utilizado como marcador específico de SNC. La proteína producto de este gen, Elav, posee tres dominios de unión a ARN y actúa como regulador del procesamiento del pre-ARNm en todas las neuronas (Koushika et al., 2000; Robinow et al., 1988). Elav, que se expresa únicamente en el SNC, regula el patrón de splicing del gen *neuroglian* (*ngr*) que genera dos isoformas: una presente de forma ubicua Ngr<sup>167</sup> y la otra propia de SNC, Ngr<sup>180</sup>. La expresión ectópica de Elav es suficiente para la expresión de la isoforma Ngr<sup>180</sup> en otros tejidos que normalmente expresan la isoforma Ngr<sup>167</sup> (Koushika et al., 1996). De este modo los factores de splicing como Elav son capaces de establecer patrones de procesamiento de ARN específicos de un tejido concreto, determinando las isoformas presentes en él.

En cuanto a la especificación de un tipo celular concreto, cabe destacar un reciente estudio que describe la interacción entre los mecanismos de regulación transcripcionales y post-transcripcionales llevados a cabo por una proteína reguladora de ambos procesos codificada por el gen *spalt major* (*salm*) (Spletter and Schnorrer, 2014). Esta proteína actúa como selector del tipo de fibra muscular determinando el destino fibra muscular tubular o fibra muscular fibrilar por medio de, por un lado, la activación de genes característicos de fibras musculares fibrilares y, por otro,

regulando el patrón de splicing del gen *Myofilin* (*Mf*) para generar la isoforma correspondiente a la fibra muscular fibrilar.

Todos estos estudios sugieren que, además de la regulación estricta por parte de los factores de transcripción durante el desarrollo, existe una regulación post-transcripcional que adquiere gran importancia en los procesos de diversidad y especificación celular.









## OBJETIVOS

---

El objetivo de esta tesis es intentar ampliar el conocimiento relacionado con los procesos de especificación celular, concretamente, la adquisición de identidad neuropeptidérgica en neuronas que tienen como origen el mismo neuroblasto. En la presente tesis, utilizando como modelo el linaje del neuroblasto NB 5-6 t de *Drosophila melanogaster*, se pretende caracterizar el papel de la proteína componente del spliceosoma *Brr2* en la diferenciación neuronal del grupo Ap.

Con este fin, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización molecular del nuevo mutante *Brr2*.
2. Caracterización fenotípica del mutante *Brr2* con marcadores de los destinos neuropeptidérgicos (*FMRFamida* y *Nplp1*) del grupo Ap.
3. Caracterizar las posibles relaciones epistáticas existentes entre *Brr2* con los componentes previamente descritos del código combinatorio responsable de la especificación del grupo Ap.
4. Esclarecer la función de *Brr2* como componente del spliceosoma dentro de los mecanismos de diferenciación del grupo Ap.







## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### **Estirpes de *Drosophila melanogaster***

Todos las líneas fueron mantenidos según la metodología en un medio de cultivo compuesto por levadura (84gr/l), azúcar (84gr/l), NaCl (3.3gr/l), agar (10gr/l), harina de trigo (42gr/l), zumo de fruta (167ml/l), y ácido propiónico como agente antimicótico (5ml/l). Todas las líneas crecieron a 25°C, con un 60% de humedad siguiendo un ciclo de 12 horas luz-oscuridad.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron distintos tipos de líneas de *Drosophila* detalladas a continuación:

### **Línea silvestre**

- ***orizo2*** (utilizada como control)

### **Alelos mutantes de *Drosophila***

- ***Brr2*<sup>09C117</sup>**, Mutación inducida por EMS en la región del gen *lethal* (3) 72Ab. La mutación fue realizada en líneas transgénicas que contenían la región reguladora de *FMRFamida* (Schneider et al., 1993) insertada en el vector pGreen H-Pelican (Barolo et al., 2000) cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine (Ulvklo et al., 2012)
- ***Brr2*<sup>13A036</sup>**, Mutación inducida por EMS en la región del gen *lethal* (3) 72Ab. La mutación fue realizada en líneas transgénicas que contenían la región reguladora de *FMRFamida* (Schneider et al., 1993) insertada en el vector pGreen H-Pelican (Barolo et al., 2000) cedido por S.Thor,

Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine (Ulvklo et al., 2012)

- ***Prp8*<sup>04P024</sup>**, Mutación inducida por EMS en la región del gen *pre-mRNA processing factor 8*. La mutación fue realizada en líneas transgénicas que contenían la región reguladora de *FMRFamida* (Schneider et al., 1993) insertada en el vector pGreen H-Pelican (Barolo et al., 2000) cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine (Ulvklo et al., 2012).
- ***pea*<sup>03F052</sup>**, Mutación inducida por EMS en la región del gen *peanuts*. cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine. La mutación fue realizada en líneas transgénicas que contenían la región reguladora de *FMRFamida* (Schneider et al., 1993) insertada en el vector pGreen H-Pelican (Barolo et al., 2000) cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine (Ulvklo et al., 2012)

## **Balanceadores**

Se utilizaron distintos cromosomas balanceadores con el fin de, por un lado, mantener aquellas líneas que producen letalidad en algún momento del ciclo vital de *Drosophila*, y por otro lado, a fin de facilitar la identificación de individuos homocigotos para las distintas mutaciones en etapas embrionarias. Los cromosomas balanceadores son cromosomas manipulados de forma que contienen diferentes reordenamientos cromosómicos a lo largo de toda su longitud, impidiendo la recombinación



durante la meiosis con su homólogo. Además, estos cromosomas balanceadores usualmente incluyen alelos mutantes de marcadores dominantes e inserciones de reporteros como el GFP, que permiten su identificación fenotípica. De este modo se pudieron identificar los individuos homocigotos y heterocigotos para los alelos mutantes de interés, objeto de este estudio (según convenga en cada experimento). Se utilizaron los siguientes cromosomas balanceadores (Bloomington *Drosophila* stock center, Indiana University):

### **Balanceadores del cromosoma II**

**CyO:** In (2LR), *Curly of Oaster*<sup>l</sup>

**CD:** In (2LR), *Curly of Oaster*<sup>l</sup>, Inserción por elemento P {*Deformed-GFP*}.

### **Balanceadores del cromosoma III**

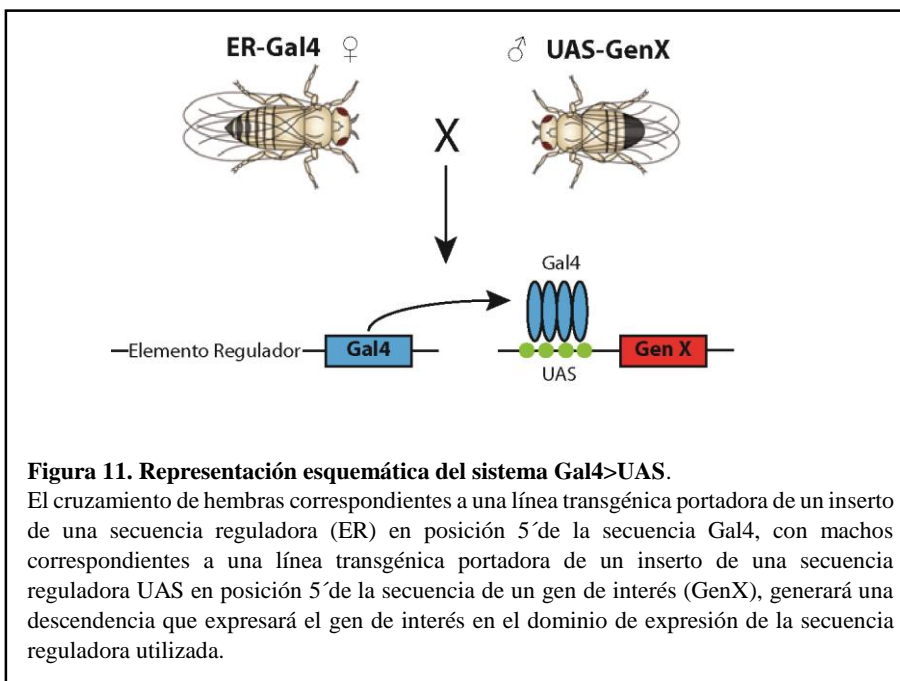
**TM6B:** In (3LR), *Third Multiple 6B*, *Stubble*<sup>l</sup>, *Tubby*<sup>l</sup>.

**TD:** In (3LR), *Third Multiple 6B*, *Antennapedia*<sup>Hu</sup>, *Stubble*<sup>l</sup>, *Tubby*<sup>l</sup>, Inserción por elemento P {*Deformed-GFP*}.

### **Sistemas de expresión dirigida Gal4-UAS y LacZ**

Se utilizaron líneas de *Drosophila* que permitían la expresión dirigida mediante el sistema Gal4>UAS (Brand and Perrimon, 1993). Esta herramienta procedente de levaduras permite la expresión *in vivo* de genes de interés en grupos de células concretos. La expresión está dirigida por el promotor situado en posición 5' de la región *Gal4*, el cual actúa como activador transcripcional uniéndose a la secuencia UAS (Upstream Activating Sequence) y por tanto, activando la expresión de cualquier gen

en posición 3' de dicha secuencia. Para ello se generaron líneas transgénicas utilizando elementos genéticos transponibles del tipo P, ya sea por medio de la clonación de la región promotora del gen cuyo patrón de expresión se quiere reproducir en posición 5' del activador Gal4, o mediante la técnica “*enhancer trap*”. De igual modo, se generan líneas transgénicas con el gen de interés en posición 3' de la secuencia activadora UAS. La descendencia del cruce de ambas líneas expresará el gen de interés en el dominio de expresión del promotor utilizado (Fig.11).



Las líneas LacZ son otro tipo de líneas que permiten la expresión dirigida *in vivo*, en este caso, de la  $\beta$ -galactosidasa. Al igual que en el sistema Gal4>UAS se generan líneas transgénicas utilizando los elementos transponibles del tipo P, clonando la región promotora de un gen de interés junto con la región LacZ perteneciente a *E.Coli*. De esta forma, se dirigirá la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa, que actuara como reportera del patrón de

expresión del gen de interés. Se utilizaron las líneas correspondientes a estos sistemas descritas a continuación:

#### **Líneas Gal4**

- *ap<sup>md544</sup>*, referido como *ap-Gal4* (O’Keefe et al., 1998), corresponde a la región promotora del gen *apterous*, Bloomington *Drosophila* stock center, Indiana University
- *elav-Gal4 2* (DiAntonio et al., 2001), corresponde a la región promotora del gen *embryonic lethal abnormal vision*, Bloomington *Drosophila* stock center, Indiana University.

#### **Líneas UAS**

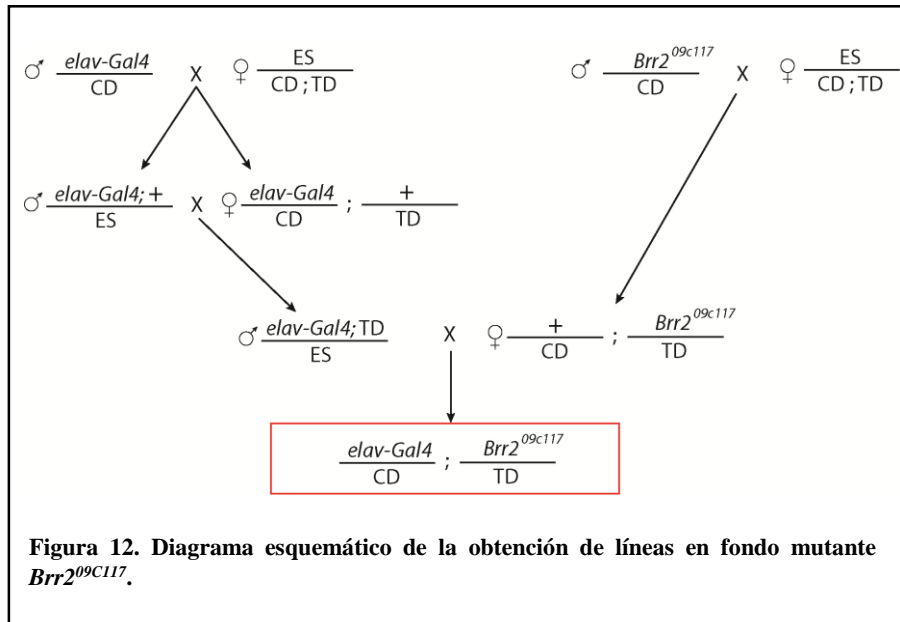
- *UAS-mCD8GFP* (Allan et al., 2003), cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine.
- *UAS-Gbb* (Allan et al., 2003), cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine.
- *UAS-sax<sup>A</sup>*, *UAS-tkv<sup>A</sup>* (Allan et al., 2003), cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine

#### **Líneas LacZ**

- *btn-lacZ* (Allan et al., 2003), cedido por S.Thor, Universidad de Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine

## Obtención de líneas en fondo mutante *Brr2*

Para la utilización de las distintas herramientas Gal4, UAS y LacZ en un fondo mutante *Brr2* se realizaron los cruzamientos descritos a continuación. Se describirá como ejemplo la línea *elav-Gal4* 2, no obstante el protocolo fue el mismo en la obtención de las restantes líneas:



## Caracterización genómica del mutante *Brr2*

Se realizó la extracción de ADN de embriones correspondientes a puestas de 24h de la línea silvestre y a la línea mutante *Brr2*<sup>09c117</sup>. Los embriones mutantes homocigóticos *Brr2* se seleccionaron manualmente bajo una lupa de fluorescencia como aquellos que no portaban el balanceador CD, y por lo tanto sin señal *Dfd-GFP*. Para la extracción de ADN se empleó la técnica de extracción mediante fenol-cloroformo descrita en *Molecular Cloning, a laboratory manual* (Sambrook et al., 1987). La correcta extracción de ADN se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.01%. El resultado de la extracción de ADN se

amplificó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando el kit “PCR Core Kit with *Taq* polymerase”, de *Sigma-Aldrich* (ref: CORET). La región génica correspondiente al gen *Brr2* tiene 7036pb. Debido a las especificaciones de este kit que indican que los fragmentos amplificados pueden perder fidelidad con la secuencia en tamaños superiores a 1000pb, se diseñaron cebadores que comprendían 8 regiones de *Brr2* que amplificaban fragmentos de unos 800-900 pb. Estos fragmentos incluían regiones solapantes entre ellos, tanto en la región 5' como en la región 3'. Los fragmentos fueron designados en función de su posición genómica como 09C117-T1 (en el extremo 5') hasta el 09C117-T8 (en el extremo 3'). Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el software *Primer3* v.0.4.0 y proporcionados por *Eurofins*. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 1. El resultado de la amplificación fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y secuenciado por el servicio de secuenciación del *Parque Científico de Madrid*. Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el software *Chromas* (v 2.4.1), reinterpretando los resultados en función de la intensidad de fluorescencia y superposiciones de señal detectada. La comparación entre secuencias del genotipo silvestre y del genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> se realizó utilizando la herramienta bioinformática BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se realizó una comparación entre la secuencia de aminoácidos predicha por la secuencia del alelo *Brr2*<sup>09C117</sup> y del genotipo salvaje mediante la misma herramienta bioinformática BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Nombre del cebador	Secuencia	Nombre del cebador	Secuencia
<i>Brr2T1</i>	CAAACATGCCCAACTG ATGA	<i>Brr2T1R</i>	CAATGAAACGGCTCCA AAGT
<i>Brr2T2</i>	ATGAGCCTGAAGCAGC AAAT	<i>Brr2T2R</i>	GGAGTGGCCTATCTCC ATGA
<i>Brr2T3</i>	CCCAGCAAAGGTCTCT GGA	<i>Brr2T3R</i>	CCTTTTATTTCGCAACGC TTC
<i>Brr2T4</i>	TTGGTGCTCCAACAAA GACA	<i>Brr2T4R</i>	GCATATTTCCGTCCGA GAAG
<i>Brr2T5</i>	CTTGGAAGTGTGCTCTT CAA	<i>Brr2T5R</i>	ATGTGCCTGGAGCAGG ATAC
<i>Brr2T6</i>	GCCGTAGGGCAATAAC TCCT	<i>Brr2T6R</i>	CTAACCATGATGCGGG AGAT
<i>Brr2T7</i>	TTCATGGGAGCCACGT AAAT	<i>Brr2T7R</i>	CGCATTTGATCACACAC TGC
<i>Brr2T8</i>	ATTATTTGCGGCTTCCT CGT	<i>Brr2T8R</i>	CGATATTTCCGCAAAA AGTTGT

**Tabla 1. Secuencias correspondientes a los cebadores utilizados para la secuenciación del alelo *Brr2*<sup>09C117</sup>.**

### **Inmunodetección de marcadores celulares**

La recolección de embriones se realizó entre las 15-24 horas de puesta de los individuos parentales, según el estadio de interés (especificado en el apartado de resultados). Las puestas se realizaron en viales ajustados sobre placas petri con levadura y papilla con la siguiente composición: 3% agar, 5,4% azúcar, y 0.1% zumo de fruta. Todas las puestas se mantuvieron a 26°C hasta el momento de su recolección. Para su recolección se separaron los embriones mediante el tamizado del medio compuesto por levadura y papilla, y lavados con agua. Posteriormente se eliminó el corion mediante su inmersión en lejía (*Lejía Conejo*®) durante 3 minutos seguido de lavados con abundante agua y solución PBT (PBS, 0,3% Tritón). Los

embriones se seleccionaron en función de su estadio y el genotipo de interés bajo una lupa de fluorescencia.

Los embriones seleccionados fueron disecados con el objeto de la extracción del SNC. La disección se realizó en PBS bajo la lupa. Lo SNC extraídos se montaron en portaobjetos previamente tratados con una solución de poli-lisina (poly-l-lysine hydrobromide, ref: P1524, *Sigma-Aldrich* y Photo-Flo, ref: 1464502, *Kodak*) para mejorar su adherencia. Los embriones montados en el portaobjetos fueron fijados con paraformaldehído (PP) al 4%, 20 minutos. Después de 1 hora tratados con solución de bloqueo BBT (PBS, 0,3% Triton, 2% BSA), se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes al experimento (indicados en resultados) durante toda la noche a 4°C. Tras esto, las preparaciones se lavaron con PBT e incubaron en oscuridad con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (según experimento, indicado en resultados) durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo se lavaron con PBT y por último se aplicó medio de montaje VectaShield (ref: H-1000, *Vector Laboratories*) y se selló con el cubreobjetos. Los anticuerpos utilizados se listan a continuación.

#### **Anticuerpos primarios utilizados:**

- Anti-Grainyhead; cedido por S. Thor (Baumgardt et al., 2009), policlonal de rata. Dilución de uso 1:1000.
- Anti- $\beta$ -galactosidasa; PROMEGA, monoclonal de ratón. Dilución de uso 1:200.
- Anti-Nab; cedido por T. Isshiki (Terriente Felix et al., 2007), policlonal de cobaya. Dilución de uso 1:500.
- Anti-Squeeze; cedido por T. Isshiki (Tsuji et al., 2008), policlonal de rata. Dilución de uso 1:750.

- Anti-Castor; cedido por W. Odenwald (Kambadur et al., 1998), policlonal de conejo. Dilución de uso 1:200.
- Anti-Collier; cedido por S. Thor (Baumgardt et al., 2007), policlonal de cobaya. Dilución de uso 1:1000.
- Anti-Dimmed; cedido por S. Thor, policlonal de cobaya (Baumgardt et al., 2007). Dilución de uso 1:1000.
- Anti-Dimmed; cedido por S. Thor (Baumgardt et al., 2007), policlonal de conejo. Dilución de uso 1:1000.
- Anti-proNplp1; cedido por S. Thor (Baumgardt et al., 2007), policlonal de pollo. Dilución de uso 1:50.
- Anti-proFMRFamida; cedido por S. Thor (Baumgardt et al., 2007), policlonal de conejo. Dilución de uso 1:1000.
- Anti-pMad; cedido por M. Pita (Cell Signaling TECHNOLOGY), policlonal de conejo. Dilución de uso 1:200.
- Anti-Dachshund; cedido por S. Thor (Baumgardt et al., 2007), policlonal de cobaya. Dilución de uso 1:1000.

#### **Anticuerpos secundarios utilizados:**

- Anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 555; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 647; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 488; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 555; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.



- Anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 647; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de rata-Alexa Fluor 555; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de pollo-Alexa Fluor 488; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de pollo-Alexa Fluor 649; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de cobaya-Alexa Fluor 488; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.
- Anti-IgG de cobaya-Alexa Fluor 649; Invitrogen, policlonal de cabra. Dilución de uso 1:500.

-

Las preparaciones fueron observadas mediante microscopía confocal de láser de barrido. Para la observación y captura de imágenes se utilizaron los equipos LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss) y LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss). En la observación y captura de imágenes, también se utilizó microscopia óptica de fluorescencia utilizando microscopio óptico Leica DM RB con lámpara de fluorescencia EBQ 100. Las imágenes fueron tomadas mediante analizadas y procesadas con el software *ImageJ* v.1.48.

El análisis estadístico de la cuantificación de los distintos marcadores se realizó mediante el análisis de tablas de contingencia, utilizando las pruebas Chi-cuadrado de Pearson y el test Monte Carlo, para determinar la asociación entre los genotipos y la distribución de los marcadores

estudiados. El tratamiento estadístico de los datos de la cuantificación de los distintos marcadores se realizó con el software *SPSS* v. 15.0.

### **Estudio de los ARNm**

Se realizó la extracción de ARN del SNC de embriones correspondientes a estadio 17 tardío de la línea silvestre y a la línea mutante *Brr2*<sup>09C117</sup>. Los embriones fueron recolectados, seleccionados y disecados siguiendo el mismo procedimiento descrito para la inmunodetección de marcadores celulares. La extracción de ARN se realizó con el kit “RNeasy Mini Kit (50)” (ref: 74104, *Quiagen*). La correcta extracción de ARN se verificó mediante la medición de absorbancia de la muestra para ácidos nucleicos utilizando el espectrofotómetro “Nanodrop 1000” (*Thermo Scientific*). La retro-transcripción y amplificación del ARN fue llevada a cabo utilizando el kit “illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads” (*GE Healthcare Life Sciences*, ref: 27-9259-01). Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación de secuencias específicas correspondientes a los genes *sax*, *tkv*, y *Nplp1*. En todos los casos los fragmentos corresponden a regiones de diferentes exones que incluyen intrones comunes a los diferentes transcritos de cada uno de los genes mencionados. Los cebadores correspondientes al gen *sax*, amplifican la región intrónica comprendida entre los exones 7 y 8; los cebadores correspondientes al gen *tkv*, amplifican la región intrónica comprendida entre los exones 6 y 7; los cebadores correspondientes al gen *wit*, amplifican la región intrónica comprendida entre los exones 6 y 7; los cebadores correspondientes al gen *Mad*, amplifican la región intrónica comprendida entre los exones 5 y 6; y los cebadores correspondientes al gen *Nplp1* amplifican la región intrónica comprendida entre los exones 3 y 4. Todos los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el software *Primer3* v.0.4.0 y proporcionados por

*Eurofins*. A continuación se muestran los cebadores utilizados, junto con los tamaños esperados de los fragmentos amplificados:

Nombre del cebador	Secuencia	Nombre del cebador	Secuencia	Tamaño (pb) esperado sin intrón	Tamaño (pb) esperado con intrón
<b>Nplp1</b>	CAGTCC CGAGTA CCAGCT TC	<b>Nplp1-R</b>	CCCAAAGG CTGTTCTTC GC	99	235
<b>Tkv</b>	GTAGGT GGGGTA CAGGTC AC	<b>Tkv-R</b>	ATGAGACG ACCGGGAT GTAC	170	232
<b>Sax</b>	GGAAGC GGGAGA CAGAGA TA	<b>Sax-R</b>	AAAGTTGG GTGCACGA GTTC	105	248
<b>Wit</b>	GGGGAGC CAGTGAT AGTACC	<b>Wit-R</b>	CAGGAGGTG GCGGTTAAG AT	181	241

**Tabla 2.** Secuencias correspondientes a los cebadores utilizados para el estudio del ARNm en los mutantes *Brr2<sup>99C117</sup>*.

Los resultados de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio al 0.01%. Se utilizó en marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (ref: 31.006, *Biotools Labs S.A.*)







## Resultados

---

### 1. Caracterización molecular del alelo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup>

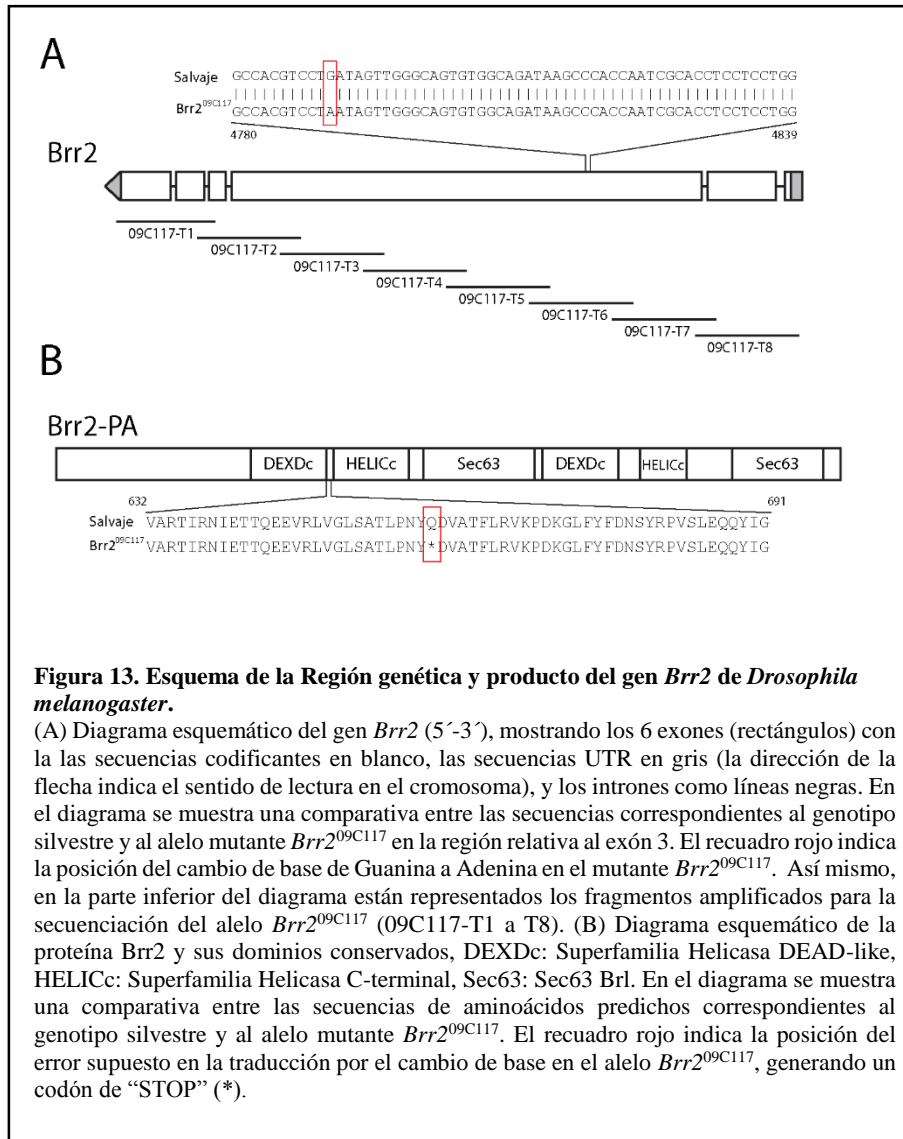
Con el objeto de esclarecer los mecanismos responsables de la especificación neuronal, el laboratorio del Dr. Stefan Thor, Departamento de Clínica y Medicina Experimental de la Universidad de Linköpin (Suecia), realizó una búsqueda masiva de posibles genes implicados en la adquisición de la identidad neuropeptidérgica FMRFamida en *Drosophila melanogaster*. Se obtuvieron 9781 líneas mutantes mediante el mutágeno EMS que mostraban alteraciones en el patrón de expresión de FMRFa en embrión tardío (estadio 17 tardío) (Ulvklo et al., 2012). En colaboración con el Dr. Stefan Thor, se identificó una de estas líneas, designada *09C117*, que mostraba la ausencia del péptido FMRFa en las neuronas del Grupo Apterous de la CNV. La mutación correspondiente a esta línea fue localizada, mediante análisis de complementación, en la región citogenética 72C1-72C1 del cromosoma 3, correspondiente al gen *Brr2* (Flybase CG5931/ L (3) 72Ab) (comunicación personal, Stefan Thor, Universidad de Linköping). A fin de determinar la posible relación entre esta línea mutante y los defectos en la especificación de las células neuropeptidérgicas del Grupo Apterous, nos propusimos caracterizar la línea mutante *09C117* para el gen *Brr2*.

El alelo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup>, designado igual que la línea correspondiente, resultó ser letal en homocigosis, no permitiendo el desarrollo de individuos más allá de larva I. Este fenotipo se corresponde con otros alelos mutantes previamente descritos para deficiencias en esta región cromosómica como *l(3)72Ab<sup>1</sup>*, *l(3)72Ab<sup>2</sup>* y *l(3)72Ab<sup>3</sup>*, entre otros (Brizuela et al., 1994). Se procedió a caracterizar el tipo de mutación generado por EMS en la línea

09C117 mediante la secuenciación genómica de la región correspondiente al gen *Brr2*. La región propia al gen *Brr2* tiene una longitud de 7036pb. Se definieron 8 segmentos para su secuenciación de alrededor de 900pb que incluían regiones solapantes entre ellos, tanto en la región 5' como en la región 3' (Fig.13 A). Los fragmentos fueron designados en función de su posición genómica como 09C117-T1 (en el extremo 5') hasta el 09C117-T8 (en el extremo 3'). La secuencia obtenida del alelo *Brr2*<sup>09C117</sup> fue comparada con la región equivalente de un individuo de genotipo silvestre de *Drosophila melanogaster*, utilizando la herramienta BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se identificaron 22 cambios de base en la secuencia y se realizó una comparación entre la secuencia de aminoácidos predicha por la secuencia del alelo *Brr2*<sup>09C117</sup> y del genotipo silvestre, encontrando que de estas 22 discordancias, 21 eran cambios silenciosos que no suponían un cambio en la traducción de aminoácidos, y tan sólo una suponía un cambio en la traducción. Este cambio en la traducción es debido a una transición de Guanina a Adenina en la posición 4790 (aa 658) en el mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> que genera un codón de "STOP" en lugar del aminoácido Glutamina. Esta transición se corresponde con la característica alquilación de Guaninas inducida por EMS. Se han identificados tres tipos de dominios conservados en la estructura primaria de *Brr2* (Fig.13 B): Superfamilia Helicasa DEAD-like (DEXDc), descrito como dominio con actividad helicasa dependiente de ATP (Gorbalenya et al., 1989), Superfamilia Helicasa C-terminal (HELICc), descrito como dominio asociado a helicasas (Bork and Koonin, 1993), y Sec63 Brl (Sec63), descrito como dominio de unión a translocadores de retículo endoplasmático (Jermy et al., 2006). El codón de STOP se sitúa en el tercer exón entre el primer dominio DEXDc y el



primer dominio HELICc (Fig. 13 B) y por tanto el alelo *Brr2*<sup>09C117</sup> generaría una proteína truncada.



Estos resultados muestran que el alelo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> muestra una sustitución en su secuencia de un par Guanina: Citosina por un par

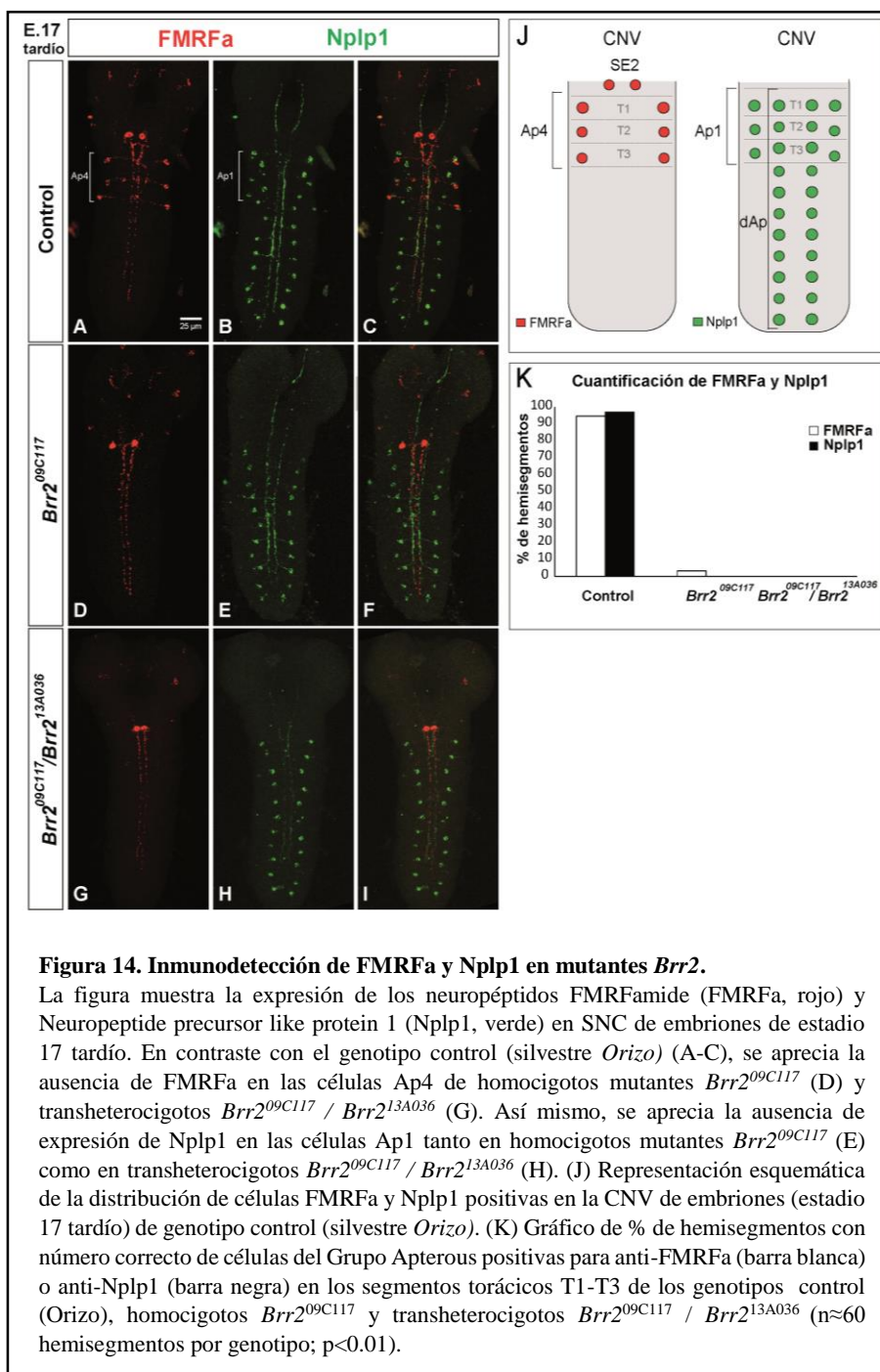
Adenina: Timina en la posición 4790, que genera un codón de “STOP” dando lugar a una proteína trunca.

## **2. Identificación de *Brr2* como determinante de los destinos neuropeptidérgicos FMRFa y Nplp1 en el Grupo Apterous.**

De las distintas líneas mutantes obtenidas por el laboratorio de Stefan Thor, la línea *09C117* mostró no sólo defectos en la expresión de *FMRFamide* (FMRFa), sino también en la expresión de *Neuropeptide like precursor 1* (Nplp1) (comunicación personal, Stefan Thor, Universidad de Linköping). Ambos neuropeptidos caracterizan la identidad de Ap4 y Ap1 respectivamente dentro del Grupo Apterous. Tal y como se describe en la introducción, tanto FMRFa como Nplp1 son neuropeptidos que no sólo se expresan en neuronas del Grupo Apterous, sino en otros grupos celulares tanto del cerebro como de la CNV (Baumgardt et al., 2007; Schneider and Taghert, 1990). Por otro lado, trabajos previos describen a *Brr2* como un componente general del spliceosoma con una expresión ubicua en *Drosophila* (Tomancak et al., 2002). Defectos en *Brr2* podrían o bien causar defectos en la expresión de FMRFa y Nplp1 en cualquier grupo celular, lo que sugeriría que *Brr2* es necesario para la expresión de estos dos neuropeptidos, o bien causar defectos de expresión de FMRFa y Nplp1 sólo en el Grupo Ap y no en otros grupos celulares, lo que sugeriría que *Brr2* se requiere para la especificación del Grupo Ap. Estas premisas plantearon la necesidad de caracterizar este fenotipo de defecto de expresión de neuropeptidos en fondo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> y esclarecer si se trata de un defecto en la expresión general de los neuropeptidos FMRFa y Nplp1, o si se trata de defectos en la expresión de estos neuropeptidos sólo en grupos celulares concretos. Con este objetivo en mente, se realizaron inmunodetecciones de ambos neuropeptidos en disecciones de SNC de

embriones tardíos (estadio 17 tardío) en fondo mutante homocigoto *Brr2*<sup>09C117</sup>.

Los resultados de la inmunodetección de FMRFa mostraron la ausencia de ésta en las células Ap4 del Grupo Apterous en los segmentos torácicos T1, T2 y T3 de la CNV en individuos homocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup> (Fig.14). La penetrancia de este fenotipo resultó ser alta, sólo el 4% de los hemisegmentos observados (n= 60) presentaban FMRFa en Ap4. Esta ausencia de FMRFa en Ap4 resultó significativamente distinta a la observada en individuos silvestres, en los que 94,7% de los hemisegmentos presentaron FMRFa (n=60, p<0,001). Todos los segmentos torácicos presentaron frecuencias similares de ausencia de FMRFa, descartando así una mayor predisposición de alguno de ellos a este fenotipo. Por el contrario, la expresión de FMRFa en las células SE2 y en células del cerebro FMRFamidérgicas, pareció no verse afectada por la falta de función de Brr2 (Fig. 14).



Respecto a la inmunodetección de Nplp1, obtuvimos resultados similares a los observados para FMRFa, es decir, ausencia de Nplp1 en las células del Grupo Apterous Ap1 en los segmentos torácicos T1, T2 y T3 de la CNV en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> (Fig.14). La penetrancia también resultó alta, mostrando un 100% de ausencia de Nplp1 en Ap1, significativamente distinto respecto a lo observado en el genotipo silvestre (n=60, p<0,001). Al igual que en el caso de FMRFa, sólo las células Ap1 correspondientes al Grupo Apterous pierden la expresión de Nplp1, no así en otras células con esta misma identidad neuropeptidérgica como las células dAp (Baumgardt et al., 2007), que mantienen la expresión de Nplp1.

Estos resultados indican que el mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> muestra defectos en la expresión de neuropéptidos FMRFa y Nplp1 específicamente en las células del Grupo Apterous, Ap4 y Ap1 respectivamente. No obstante, a pesar de haber determinado un defecto en el gen *Brr2* que genera una proteína truncada en esta línea, éste podría no ser el responsable del defecto en la expresión de neuropéptidos. El mutágeno EMS genera mutaciones puntuales no dirigidas con una tasa de  $5 \times 10^{-4}$ -  $5 \times 10^{-2}$  por gen (Meck Index 11ª ed.), de tal modo que, además de la mutación detectada en el gen *Brr2*, podrían haberse inducido mutaciones en otros genes no controlados en el estudio, que a su vez podrían ser los responsables del fenotipo de ausencia de expresión de FMRFa y Nplp1 en el Grupo Apterous. Se realizaron test de complementación para determinar si este efecto se debe efectivamente a la mutación detectada en el gen *Brr2* y por tanto éste es determinante para la correcta especificación de neuropéptidos en el Grupo Apterous, o si por el contrario, es debida a algún otro defecto en otro gen no controlado en estudios previos. Utilizamos individuos que portaban el alelo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> y fueron cruzados con individuos de la línea *13A036*, que presenta una mutación para la misma región citogenética correspondiente

al gen *Brr2* (Comunicación personal, Stefan Thor, Universidad de Linköping). Designaremos el alelo mutante de la línea 13A036 como *Brr2*<sup>13A036</sup>. De esta forma se generaron individuos transheterocigóticos *Brr2*<sup>09C117</sup>/*Brr2*<sup>13A036</sup>. Puesto que las mutaciones inducidas por EMS son de carácter aleatorio, existe muy baja probabilidad de que en estos individuos transheterocigotos, coincidan otras mutaciones en los mismos locus además de la localizada en *Brr2*. De este modo, se podrá atribuir el fenotipo de ausencia de FMRFa y Nplp1 a los defectos observados en el gen *Brr2*. Asimismo, se realizaron inmunodetecciones de ambos neuropéptidos en individuos heterocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup>/+ y *Brr2*<sup>13A036</sup>/+ a fin de determinar un posible efecto dominante de alguna de las dos mutaciones. Ninguna de las dos mutaciones en heterocigosis mostró diferencias ni en FMRFa ni en Nplp1 respecto al fenotipo silvestre, descartando así un efecto dominante de los alelos *Brr2*<sup>09C117</sup> y *Brr2*<sup>13A036</sup>.

La inmunodetección de FMRFa en los individuos transheterocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup> / *Brr2*<sup>13A036</sup> resultó mostrar el mismo fenotipo de ausencia de expresión observado para mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> homocigotos, es decir, falta de expresión de FMRFa en las células Ap4 de todos los segmentos torácicos del Grupo Apterous (Fig.14). Al igual que se observó en los individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>, las células SE2 mantuvieron la expresión de FMRFa. Respecto a la inmunodetección de Nplp1, se observaron idénticos resultados a los observados en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> homocigotos, corroborando la ausencia de este neuropéptido en las células Ap1 de los segmentos torácicos y manteniendo su expresión en células dAp.

Los resultados observados en los mutantes *Brr2* respecto a los defectos de expresión de neuropéptidos en las células Ap4 y Ap1 del Grupo Apterous, eran compatibles tanto con un defecto de especificación de estas neuronas

como con una ausencia total de las mismas. Resultó necesario esclarecer si la falta de FMRFa y Nplp1 se debe a errores en los procesos de regulación y adquisición de una determinada identidad neuropeptidérgica, o a defectos en la supervivencia celular del Grupo Apterous. Se realizó la inmunodetección de *Eya* que permite la identificación de forma inequívoca de las células torácicas del Grupo Apterous. Los resultados de la inmunodetección de *Eya* (estadio 16 y 17 tardío) revelaron que las cuatro células del Grupo Apterous están presentes en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>, por lo que podemos desestimar la muerte o no generación de las células Ap1 y Ap4 (Fig.15 y 16).

Estos resultados revelan como necesaria la correcta expresión de *Brr2* para la apropiada adquisición de identidad neuropeptidérgica FMRFa y Nplp1 por parte de las células del Grupo Apterous Ap4 y Ap1 respectivamente, no así en otras células que, aun expresando estos mismos neuropéptidos, pertenecen a otros grupos celulares de linajes distintos. Estos resultados son consistentes con estudios previos que establecen que distintas neuronas *FMRF*amidérgicas, las células Ap4 y las células SE2, están determinadas por distintos códigos combinatorios de especificación, a su vez dirigidos por distintos factores de transcripción temporales en uno y otro (Losada-Pérez et al., 2010). De esta forma, *Brr2* parece pertenecer a un código combinatorio que determina los destinos celulares tardíos de la progenie del Neuroblasto 5-6 o, al menos, podría actuar como regulador de alguno de los componentes de los mismos.

### **3. Relaciones epistáticas existentes entre *Brr2* y los componentes del código combinatorio responsable de la especificación del Grupo Apterous.**

Tal y como se ha descrito en el apartado previo, la falta de función de *Brr2* resulta en anomalías en la expresión de neuropéptidos en un grupo celular concreto, el Grupo Apterous. Este grupo de 4 células que provienen del mismo Neuroblasto (NB 5-6), sigue un patrón de especificación concreto definido por una cascada de señalización de factores temporales que modifican la competencia del progenitor, dando lugar a distintas identidades celulares (Baumgardt et al., 2007). Tal y como se describe en la introducción, el tipo de factor temporal determina la correcta especificación de cada neurona dentro del Grupo Apterous. Procedimos a verificar la presencia de los factores que determinan la identidad de las células Ap1 y Ap4 en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> a lo largo del linaje del NB 5-6, con el objeto de establecer y situar temporalmente la acción de *Brr2* dentro de este código de especificación. Alteraciones en el patrón de expresión de los factores de este código combinatorio específicos de Ap1 y Ap4 en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>, revelarán dónde y cuándo *Brr2* tiene un papel clave en la especificación de los distintos destinos neuropeptidérgicos.

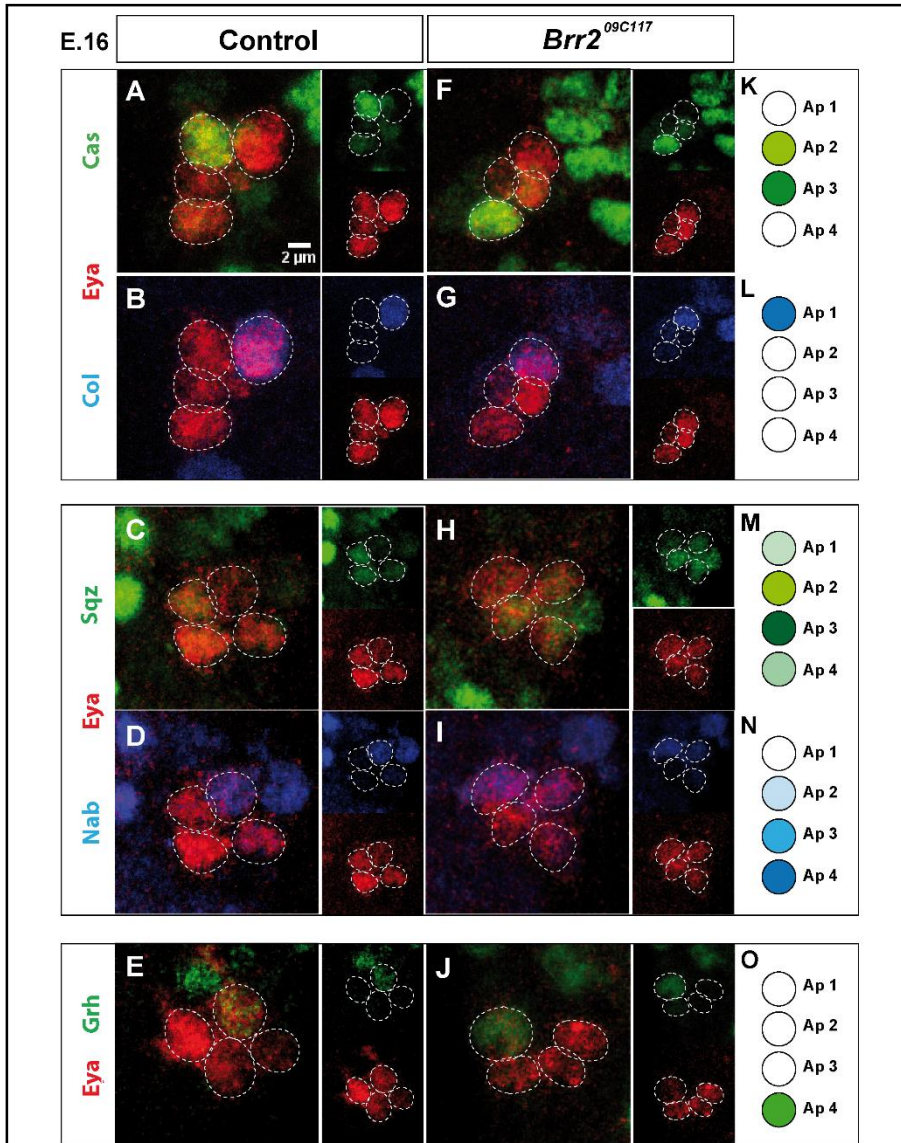
#### **3.1 Los componentes tempranos del código combinatorio de especificación del Grupo Apterous no se ven afectados en los mutantes *Brr2*.**

El código de especificación de las células del Grupo Apterous a nivel postmitótico comienza con la acción del factor de transcripción *castor* (cas). Tal y como se describe en la introducción, Cas es un factor crucial en la especificación de los destinos de las células Ap1 y Ap4 y activa tres cascadas de señalización paralelas dentro del Grupo Apterous siguiendo



un patrón temporal específico que determinará cada uno de los destinos de las células que componen este grupo . Por un lado induce la expresión de *collier* (*col*), que a su vez activará la expresión de *apterous* (*ap*) y *eyes absent* (*eya*). Por otro lado induce la expresión de *squeeze* (*sqz*) y *nab* que reprimen la expresión de *col*. Por último Cas también activa la expresión de *grainyhead* (*grh*), que siguiendo un patrón de retroalimentación negativa, reprime la expresión de *cas*. La progresión de estas cascadas de señalización en el momento del nacimiento y maduración de las células del Grupo Apterous permitirán establecer el destino celular propio de cada una.

Se realizó la inmunodetección y cuantificación de los patrones de expresión de los factores Cas, Col, Grh, Sqz, y Nab en estadio 16, correspondiente al momento en el que el Neuroblasto ha sufrido los procesos de senescencia y las cuatro células del Grupo Apterous están presentes pero no han terminado de adquirir su identidad (aunque ya muestran factores característicos de su futuro destino celular). No se encontraron diferencias significativas ni en mutantes homocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup>, ni en mutantes transheterocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup>/*Brr2*<sup>13A036</sup>, para ninguno de los factores estudiados en ninguno de los segmentos torácicos de la CNV correspondientes a embriones de estadio 16 (Fig.15). Por tanto, en mutantes *Brr2* hasta estadio 16, las células Ap1 y Ap4 mantienen la expresión de marcadores propios del código de especificación celular de sus respectivos destinos, sin mostrar alteración en éste proceso.



**Figura 15. Marcadores tempranos determinantes de identidad del Grupo Apterous en mutantes *Brr2*.**

Inmunodetección de Eyes absent (Eya), Castor (Cas), Collier (Col), Squeeze (Sqz), Nab y Grainyhead (Grh) en las células del Grupo Apterous de un hemisegmento torácico de la CNV de embriones de estadio 16 control (silvestre *Orizo*) (A-E) y mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> (F-J). No se encuentran diferencias significativas entre individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> e individuos control para ninguno de los marcadores estudiados. (K-O) Representación esquemática para la expresión de los distintos marcadores estudiados en el Grupo Apterous en estadio 16. La intensidad de color refleja los niveles relativos de proteína.

Según lo anteriormente descrito, los resultados sugieren que el NB 5-6 ha progresado normalmente generando las cuatro células del Grupo Apterous y que éstas han continuado la cascada de señalización temporal iniciada por *castor* en el Neuroblasto, pre-estableciendo los tres destinos celulares de este grupo (Baumgardt et al., 2007, 2009).

### **3.2 Brr2 es necesario para la correcta expresión de los factores Dimm y pMad, componentes tardíos del código combinatorio de especificación del Grupo Apterous.**

Tras comprobar la correcta activación del código de especificación del Grupo Apterous a nivel postmitótico en los mutantes *Brr2*, se procedió a identificar defectos tardíos en la cascada de señalización que expliquen el fenotipo de falta de expresión de FMRFa y Nplp1 en dichas células. Una vez Cas desencadena las tres vías de señalización antes mencionadas, cada célula del Grupo Apterous comienza a adquirir su destino específico. En el caso de Ap1, se ha descrito que la acción de Ap, Eya y Col activa la transcripción de Dimmed (Dimm) que a su vez, junto con Col y Eya, son necesarios para la expresión del neuropéptido Nplp1 (Baumgardt et al., 2007). En el caso de Ap4, los factores Ap y Eya activan la expresión de Dimm mientras los factores Sqz y Nab reprimen la expresión de *col*. Por otro lado Grh y Eya estimulan los procesos de proyección axonal de Ap4 al Órgano Neurohemal que, por medio de señalización retrógrada, activan la cascada de señalización BMP/TGF- $\beta$ , lo que se traduce en la fosforilación del factor Mothers against dpp (Mad). En conjunto, para la expresión del neuropéptido FMRFa en Ap4, se requiere la presencia de Ap, la activación de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$  y la expresión del

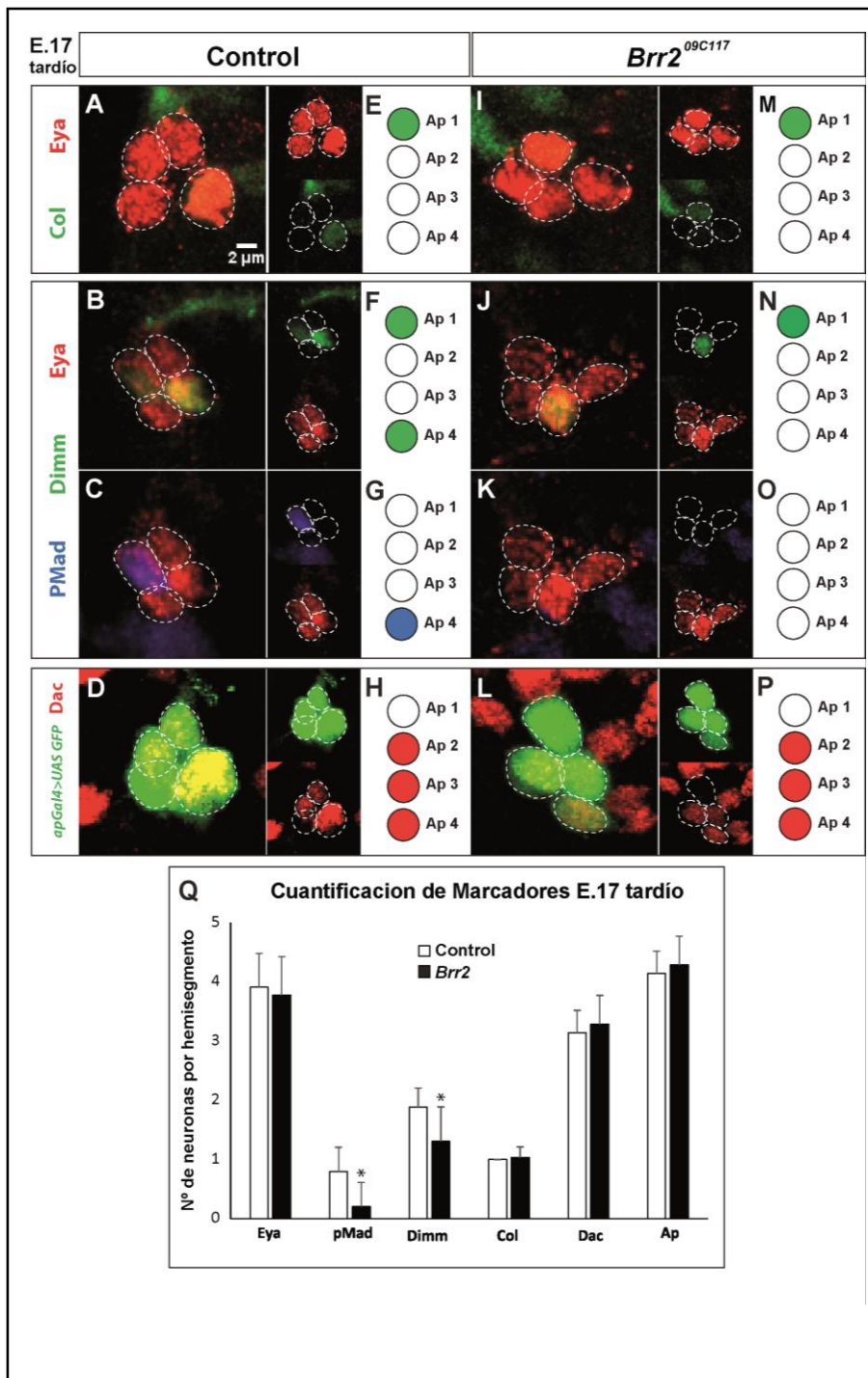
factor de transcripción Dachshund (Dac) (Allan et al., 2003; Baumgardt et al., 2007; Miguel-Aliaga et al., 2004).

Se realizó la inmunodetección y cuantificación de los patrones de expresión de los factores *ap*, Eya, Col, Dac, Dimm y la forma fosforilada de Mad (pMad) en estadio 17 tardío, momento en el que las 4 células están completamente especificadas en sus respectivos destinos. No se encontraron diferencias significativas ni en mutantes homocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup> ni en mutantes transheterocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup>/*Brr2*<sup>13A036</sup>, para los marcadores Col, Eya, *ap* y Dac en ninguno de los segmentos torácicos de la CNV correspondientes a embriones de estadio 17 tardío (Fig.16). Por el contrario, sí se encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión de los factores Dimm y pMad en los segmentos torácicos T1, T2 y T3 tanto en individuos *Brr2*<sup>09C117</sup> como en transheterocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup>/*Brr2*<sup>13A036</sup>.

La inmunodetección de la forma fosforilada de Mad (pMad) reveló la ausencia de expresión de la misma en la neurona Ap4 en individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> (Fig. 16 C y K). Se realizó un análisis cuantitativo de la frecuencia de ausencia de pMad en Ap4. El 20,4 % de los hemisegmentos cuantificados correspondientes al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> mostró pMad en Ap4, significativamente distinto al 79,4% observado en el genotipo silvestre (n=49, p<0,001). Los individuos del genotipo transheterocigoto *Brr2*<sup>09C117</sup>/*Brr2*<sup>13A036</sup> mostraron también la ausencia de pMad en Ap4 con una frecuencia de detección del marcador del 3% (n=36 p<0,001). La inmunodetección reveló señal positiva en otras células no pertenecientes al Grupo Apterous, lo que indica que el efecto observado es específico en Ap4 y no debido a un defecto generalizado de Mad o su fosforilación en la CNV. Se analizaron los distintos segmentos torácicos de forma independiente con objeto de identificar segmentos más

sensibles a la pérdida de pMad. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de ausencia de pMad ni en T1, ni en T2 ni en T3 ( $p=0,672$ ). De esta forma podemos afirmar que los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> presentan defectos en la expresión o en la fosforilación del factor Mad en Ap4 y que éstos no son específicos de un determinado segmento.

El factor de transcripción Dimm mostró diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de ausencia de expresión en individuos *Brr2*<sup>09C117</sup> respecto individuos silvestres (Fig.16 B y J). Según se ha descrito anteriormente, Dimm es necesario, aunque no determinante, para la correcta especificación tanto de Ap1 como de Ap4 y está presente en 2 células (Ap1 y Ap4) de las 4 que componen el Grupo Apterous en cada hemisegmento (Allan et al., 2005). Se observó pérdida de Dimm en al menos una de las células del grupo Ap en el 57,1% de los hemisegmentos cuantificados correspondientes al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup>, significativamente distinto al 11,8% observado en el genotipo silvestre ( $n=49$   $p<0,001$ ). Éste fenotipo se observó de forma más acusada en individuos transheterocigotos *Brr2*<sup>09C117</sup>/*Brr2*<sup>13A036</sup>, encontrando Dimm en tan sólo una célula del Grupo Apterous en el 75% de los casos ( $n=36$   $p<0,001$ ). Del mismo modo que realizamos anteriormente, analizamos los distintos segmentos torácicos de forma independiente para detectar segmentos más susceptibles a la pérdida de Dimm. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de ausencia de Dimm ni en T1, ni en T2 ni en T3 ( $p=0,620$ ).



**Figura 16. Marcadores tardíos determinantes de identidad del Grupo Apterous en mutantes *Brr2*.**

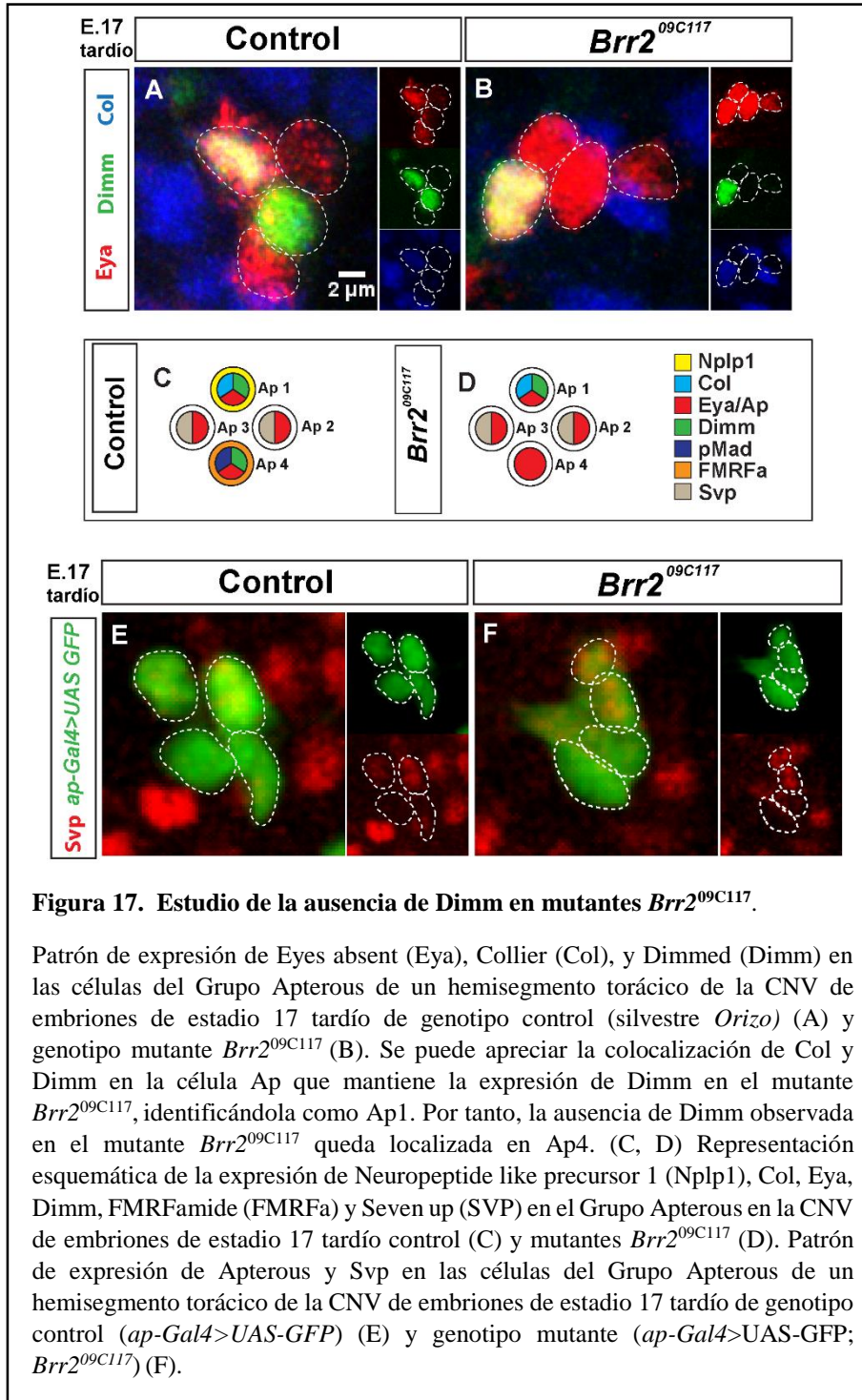
Patrón de expresión de *apterous* (*ap-Gal4>UAS-GFP*), Eyes absent (*Eya*), Collier (*Col*), Dimmed (*Dimm*), forma fosforilada de Mothers against dpp (*pMad*) y Dachshund (*Dac*) en las células del Grupo Apterous de un hemisegmento torácico de la CNV de embriones de estadio 17 tardío control (silvestre *Orizo*) (A-D) y mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> (I-L). Cada panel muestra una representación esquemática de la expresión de los distintos marcadores estudiados en el Grupo Apterous en la CNV de embriones de estadio 17 tardío. Se puede apreciar la ausencia de *Dimm* (J) y de *pMad* (K) en individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. (Q) Representación gráfica de la media ( $\pm$ D.T) de neuronas por hemisegmento del Grupo Apterous positivas para la inmunodetección de los marcadores *Eya*, *pMad*, *Dimm*, *Col*, *Dac* y *Ap*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre individuos control (silvestre *Orizo*) (blanco) y mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> (negro) ( $n \approx 40$  hemisegmentos por genotipo;  $p < 0.001$ ).

Con objeto de identificar si la ausencia de *Dimm* se encuentra localizada en Ap1 o en Ap4 se realizó una colocalización con *Col*, cuya expresión en estadio 17 tardío dentro del Grupo Apterous está restringida a Ap1 y en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> parece no estar afectada (Fig.16 A y B). Los resultados localizaron la ausencia de *Dimm* en Ap4 en el 100% de los casos ( $n=24$ ), por tanto podemos afirmar que siempre que *Dimm* está ausente en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>, lo está en Ap4. Además, podemos concluir que la célula Ap1 en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> no muestra diferencias en la expresión de *Dimm* respecto a los individuos silvestres.

Por otro lado, con objeto de esclarecer si la ausencia parcial de *Dimm* en Ap4 podría deberse a defectos en la expresión de *seven up* (*svp*), inhibidor específico de la expresión de *dimm* en Ap2 y Ap3 (Benito-Sipos et al., 2011), se realizó la inmunodetección de *Svp* en estadio 17 tardío. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *Svp* en individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> respecto a individuos control (Fig.17 E y F).

Según los resultados obtenidos podemos afirmar que *Brr2* es necesario para la correcta expresión de Dimm y la correcta expresión o fosforilación de Mad en Ap4. Cabe destacar que, si bien es cierto que Dimm es necesario para alcanzar unos niveles adecuados de FMRFa en Ap4 (Allan et al., 2005), la frecuencia de ausencia de Dimm (57%) en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> no se corresponde con la frecuencia de ausencia de FMRFa (90%). Por otro lado, teniendo en cuenta la frecuencia de ausencia de pMad en Ap4 (97%) en estos mutantes, junto con experimentos previos que identifican la presencia de pMad como absolutamente necesario para la expresión de FMRFa (Allan et al., 2003), podemos atribuir la falta de especificación de Ap4 en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> a la ausencia de pMad. Por otra parte, los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> no muestran defectos en el patrón de expresión en los marcadores correspondientes al código de especificación de Nplp1 en Ap1 descritos hasta el momento.





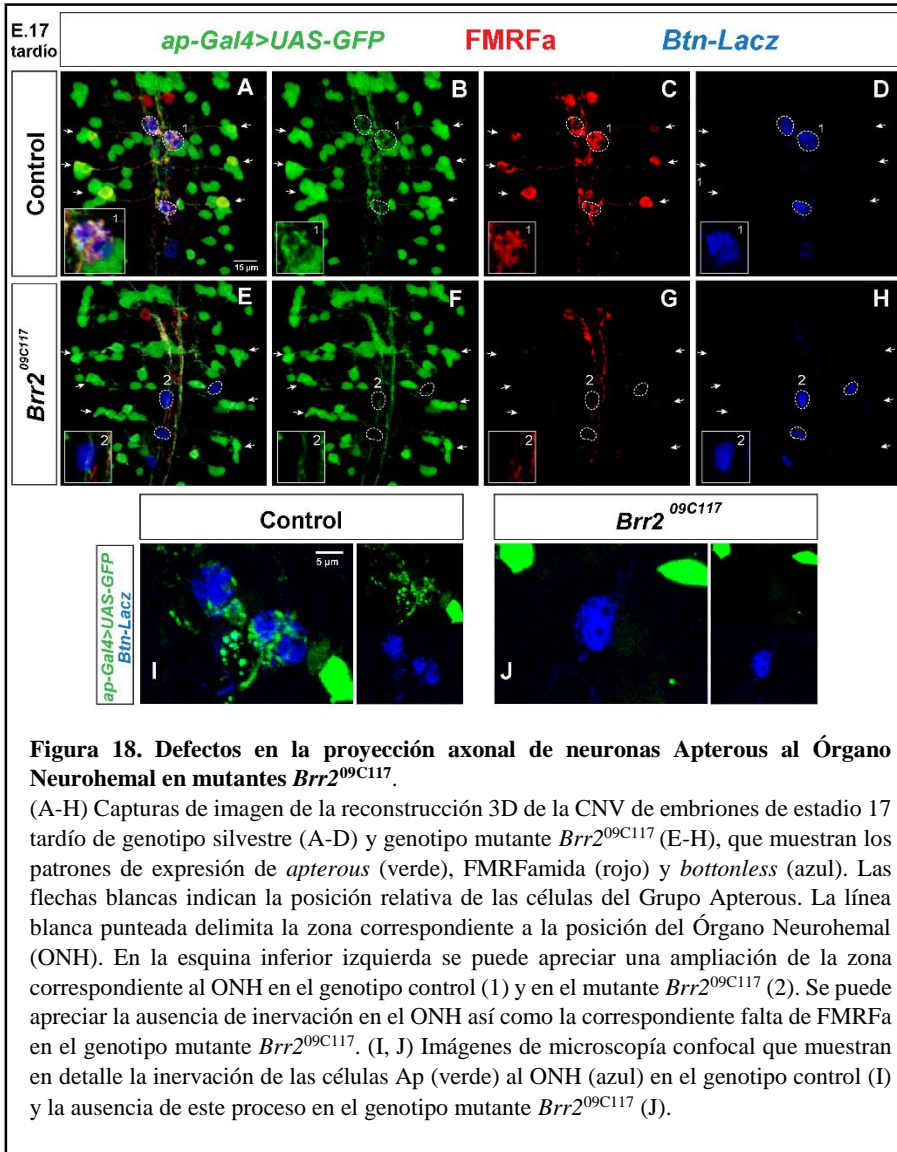
#### **4. Implicación de *Brr2* en los procesos de axonación y señalización retrógrada vía BMP en Ap4.**

Tal y como se ha descrito en la introducción, la síntesis de FMRFa en Ap4 requiere de la activación de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$ . Para la activación de esta ruta se requiere la invasión del Órgano Neurohemal (ONH) por parte de Ap4, que recibirá una señal retrógrada mediada por el ligando Glass bottom boat (Gbb). Éste se unirá a los receptores BMP formados por un homodímero de Wishful thinking (Wit), y un heterodímero Thickveins (Tkv) y Saxophone (Sax), que promoverán la fosforilación del factor de transcripción Mad desencadenando, junto con otros factores, la expresión de FMRFa (Marqués et al., 2003). Tal y como se ha descrito en el anterior apartado, los individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> se caracterizan por la ausencia de pMad, lo que indica que la señalización BMP/TGF- $\beta$  está interrumpida en alguno de sus puntos. Se procedió a determinar a qué nivel de esta ruta de señalización podría actuar *Brr2* y cuál de sus componentes podría estar afectado por la pérdida de función de *Brr2*.

##### **4.1 *Brr2* es necesario para la correcta invasión del Órgano Neurohemal por parte de la neurona Ap4**

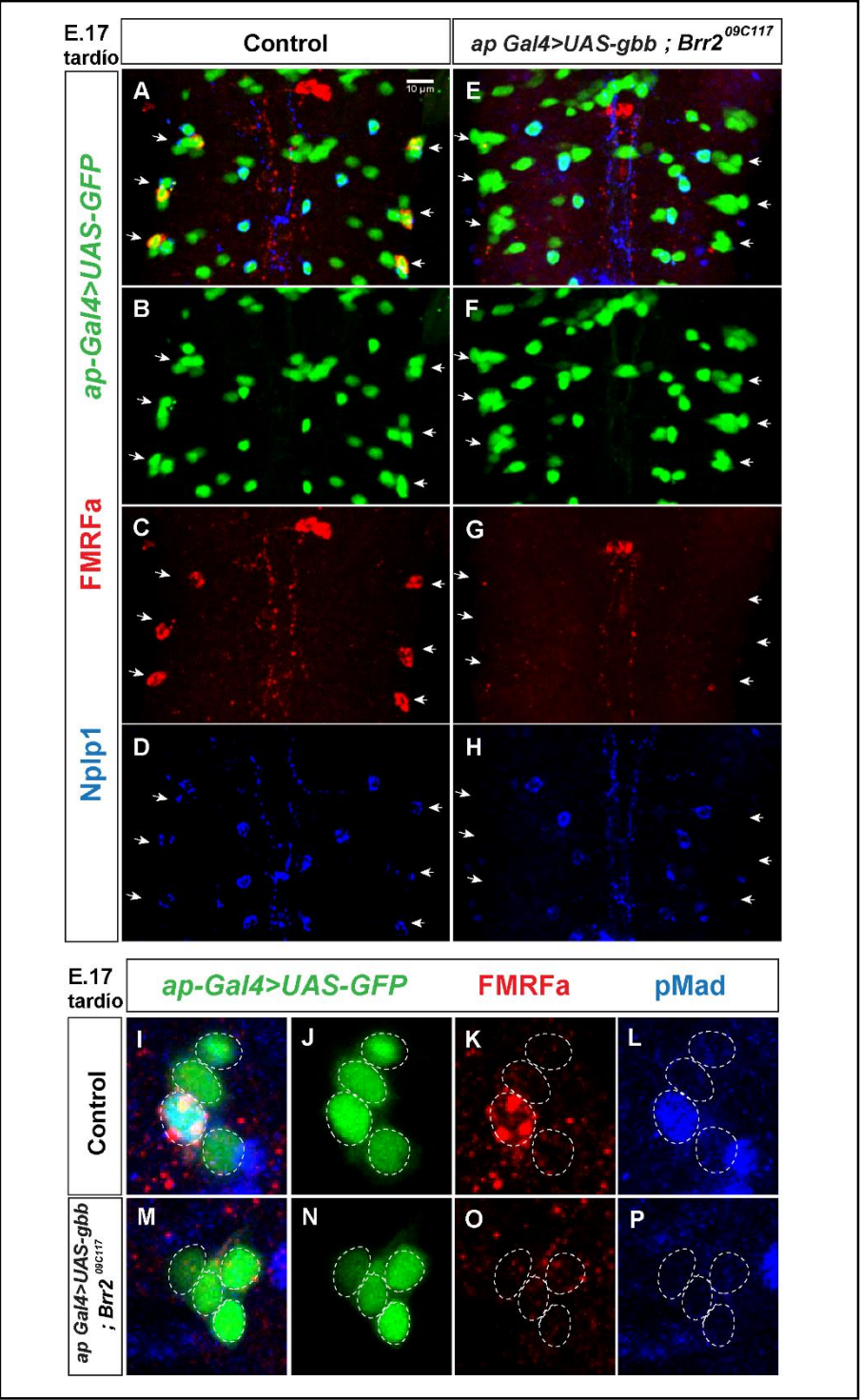
Se realizó el estudio de las proyecciones axonales del Grupo Apterous para determinar la correcta invasión del ONH por parte de Ap4, ya que ésta resulta determinante para la activación de la ruta de señalización BMP y la expresión de FMRFa (Allan et al., 2003). Se utilizó como marcador la proteína GFP de membrana dirigiéndola con la región reguladora de *ap* para observar las proyecciones de Ap4. A su vez se utilizó la construcción Bottonless-LacZ para inmunodetectar el Órgano Neurohemal (Allan et al.,

2003). El estudio de las imágenes de microscopía confocal junto con reconstrucciones 3D de las proyecciones de las neuronas del Grupo Apterous reveló un defecto en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> en la invasión del Órgano Neurohemal (Fig. 18). Este resultado sugiere que la vía BMP/TGF- $\beta$  no está activa por la falta de señalización retrógrada en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> y por tanto no promueve la fosforilación de Mad.



Estudios previos han determinado que el ligando Gbb, liberado por el ONH, es el responsable de la activación de la ruta de señalización vía BMP/TGF- $\beta$  en la neurona Ap4 (Allan et al., 2003). Mutantes para el gen *sqz* responsable de la axonación de Ap4, así como la expresión ectópica en Ap4 de *roundabout (robo)*, receptor de membrana que determina repulsión hacia la línea media de la CNV, resultaron en la pérdida de expresión en FMRFa (Allan et al., 2003). En ambos casos la pérdida de FMRFa se produce por la falta de activación de la ruta BMP, y en ambos casos debida a la ausencia del ligando Gbb generados por defectos en la axonación al ONH. En ambos tipos de mutantes, la expresión ectópica de Gbb en Ap4 fue capaz de revertir o “rescatar” el fenotipo de falta de expresión de FMRFa (Allan et al., 2003). En este sentido, se realizaron experimentos de rescate de fenotipo mediante la expresión ectópica de *gbb* en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>, utilizando el sistema Gal4 UAS, a través de la región reguladora de *ap*.

Se realizaron inmunodetecciones para FMRFa y pMad en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> que expresan de forma ectópica *gbb* en las neuronas del Grupo Ap. Adicionalmente se utilizó la expresión de GFP en el dominio *ap* (*ap-Gal4>UAS-GFP*), para la localización del grupo Ap. No se observó rescate de fenotipo ni en la expresión de *FMRFa*, ni en la expresión de pMad en Ap4. (Fig.19). Los patrones de expresión de los marcadores observados se mantuvieron inalterados respecto de los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. Estos resultados demuestran que la expresión del ligando Gbb, que capacitaría a Ap4 a activar la ruta de señalización BMP, no es capaz de desencadenar la fosforilación de Mad, y por tanto de rescatar el fenotipo de ausencia de FMRFa. Adicionalmente, se realizó la inmunodetección de *Nplp1* en estos mutantes, a pesar de no haber sido descrita la implicación de la ruta BMP en los procesos de axonación en Ap1. Según lo esperado, tampoco se obtuvo rescate del fenotipo de ausencia de *Nplp1* mediante la expresión de Gbb en el dominio *ap*.



**Figura 19. La expresión de Gbb en neuronas Ap no rescata los defectos en individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>.**

Patrón de expresión de *apterous* (*ap-Gal4>UAS-GFP*), FMRFa (FMRFa) Neuropeptide precursor like protein 1 (Nplp1) y forma fosforilada de Mothers against dpp (pMad) en embriones de estadio 17 tardío de genotipo control (*ap-Gal4>UAS-GFP/UAS-gbb*) (A-D; I-L) y genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> (*ap-Gal4>UAS-GFP/UAS-gbb; Brr2*<sup>09C117</sup>) que expresan Gbb en el Grupo Ap (E-H; M-P). Las flechas indican la situación del Grupo Ap. (A-H) Se puede observar que la expresión dirigida de Gbb a las neuronas del Grupo Ap no recupera la expresión ni de FMRFa ni de Nplp1 en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. (I-P). La expresión dirigida de Gbb a las neuronas del Grupo Ap tampoco recupera la ausencia de pMad), indicando que la vía BMP/TGF- $\beta$  no está activa en estos mutantes.

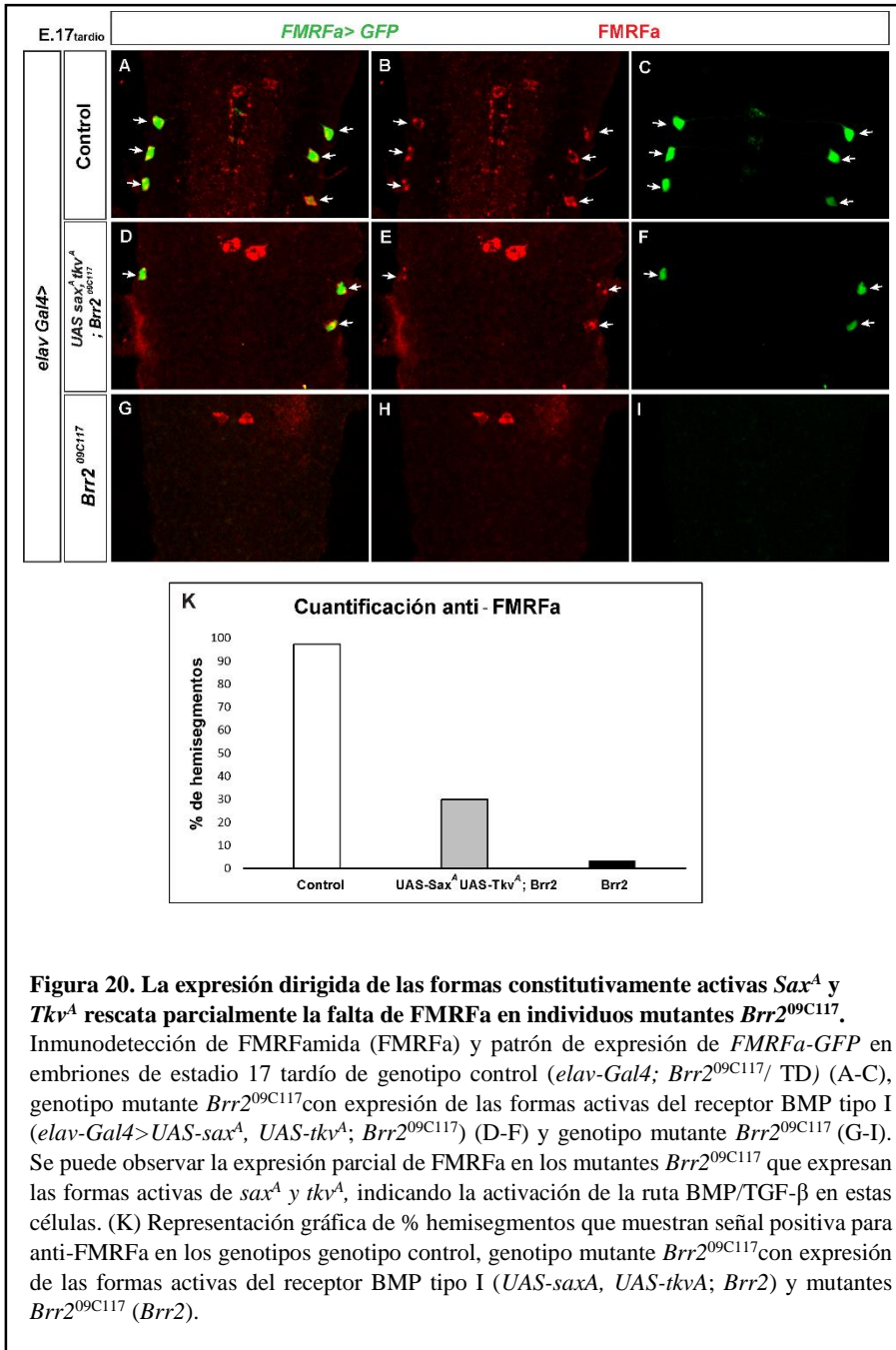
Los resultados observados sugieren que *Brr2* es necesario para la correcta innervación de Ap4 al ONH. Trabajos anteriores han demostrado que la expresión de Gbb en el dominio *ap* es capaz de restituir la activación de la señalización BMP, y por tanto de pMad y FMRFa, en la célula Ap4 de mutantes con defectos de proyección axonal similares (Allan et al., 2003). Sin embargo, nuestros datos demuestran que la expresión de Gbb no es suficiente para rescatar pMad y FMRFa en los mutantes *Brr2*, lo que sugiere que *Brr2* juega un papel adicional, independiente de su efecto sobre proyección axonal, en la activación de la ruta BMP.

#### **4.2 *Brr2* es necesario para la correcta expresión y/o activación de los receptores BMP de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$ en Ap4.**

A la luz de los resultados observados en el apartado anterior, *Brr2* podría estar implicado en la activación de la señalización BMP. Teniendo en cuenta el funcionamiento y los componentes descritos hasta el momento implicados en la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$ , se plantearon dos posibles situaciones en las que *Brr2* podría actuar. En primer lugar *Brr2* podría regular la expresión o procesamiento de los componentes del receptor BMP-el homodímero formado por Wit y/o el heterodímero formado por Sax y Tkv o/y en los elementos necesarios para su transporte o ensamblaje. En segundo lugar, *Brr2* podría regular la expresión o

procesamiento de *Mad*, o/y su transporte retrógrado al núcleo. Con objeto de discernir entre estas dos posibilidades realizamos un experimento de rescate de fenotipo mediante la expresión de formas constitutivamente activas de *sax* (*sax<sup>A</sup>*) y *tkv* (*tkv<sup>A</sup>*) (Haerry et al., 1998) en mutantes *Brr2<sup>09C117</sup>*, utilizando el sistema Gal4/UAS a través de la región reguladora de *elav*. La región reguladora de *elav* dirige la expresión a todas las neuronas del SNC desde estadios tempranos en el desarrollo. Estudios previos han descrito la eficacia de la expresión de *sax<sup>A</sup>* y *tkv<sup>A</sup>* mediante este sistema en la activación de la ruta BMP y en la fosforilación de Mad, así como en el rescate del fenotipo de FMRFa en mutantes deficientes para la señalización BMP (Allan et al., 2003; Haerry et al., 1998; Losada-Pérez et al., 2010). De esta forma, el rescate del fenotipo de pérdida de FMRFa en estos mutantes y/o la presencia de pMad, será indicativo de una función de *Brr2* a nivel de alguno o varios de los receptores BMP.

Se realizaron inmunodetecciones para FMRFa en mutantes *Brr2<sup>09C117</sup>* que expresaban *sax<sup>A</sup>* y *tkv<sup>A</sup>* en todas las neuronas, incluidas las correspondientes al Grupo Apterous. Además, se aprovechó la construcción *FMRFa-EGFP* insertada en la línea mutante 09C117 (Ulvklo et al., 2012), para comprobar si había activación de la región promotora de *FMRFa*. En caso de activarse la región promotora y no haber inmunodetección, podríamos determinar que existe algún defecto en el procesamiento del ARN correspondiente a *FMRFa* o en la síntesis (traducción y/o modificaciones post-transduccionales) del péptido. La inmunodetección de FMRFa reveló un rescate parcial en mutantes *Brr2<sup>09C117</sup>* que expresaban *sax<sup>A</sup>* y *tkv<sup>A</sup>* (Fig.20), revelando la presencia de este neuropéptido en un 29,8% de los hemisegmentos observados (n=84), significativamente distinta tanto de los individuos control que mostraron un 97,3% de presencia del neuropéptido (n=74, p<0,001) como de los individuos mutantes *Brr2<sup>09C117</sup>*, que mostraron un 3,3% (n=60, p<0,001). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de *FMRFa-GPF* respecto a la inmunodetección de FMRFa, lo que sugiere que el defecto en FMRFa es sólo atribuible a defectos en la transcripción.





Estos resultados sugieren que *Brr2* es necesario para la activación de los receptores BMP y por tanto para la activación de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$ . Debido a que estudios previos han descrito la posibilidad de rescatar, mediante la expresión dirigida de *sax*<sup>A</sup> y *tkv*<sup>A</sup>, fenotipos correspondientes a mutantes *wit*, *sax* o *tkv* (Allan et al., 2003; Haerry et al., 1998; Losada-Pérez et al., 2010), *Brr2* podría regular la expresión o procesamiento de uno o varios de los componentes del receptor BMP *wit*, *sax* y/o *tkv* así como en los elementos necesarios para su transporte o ensamblaje.

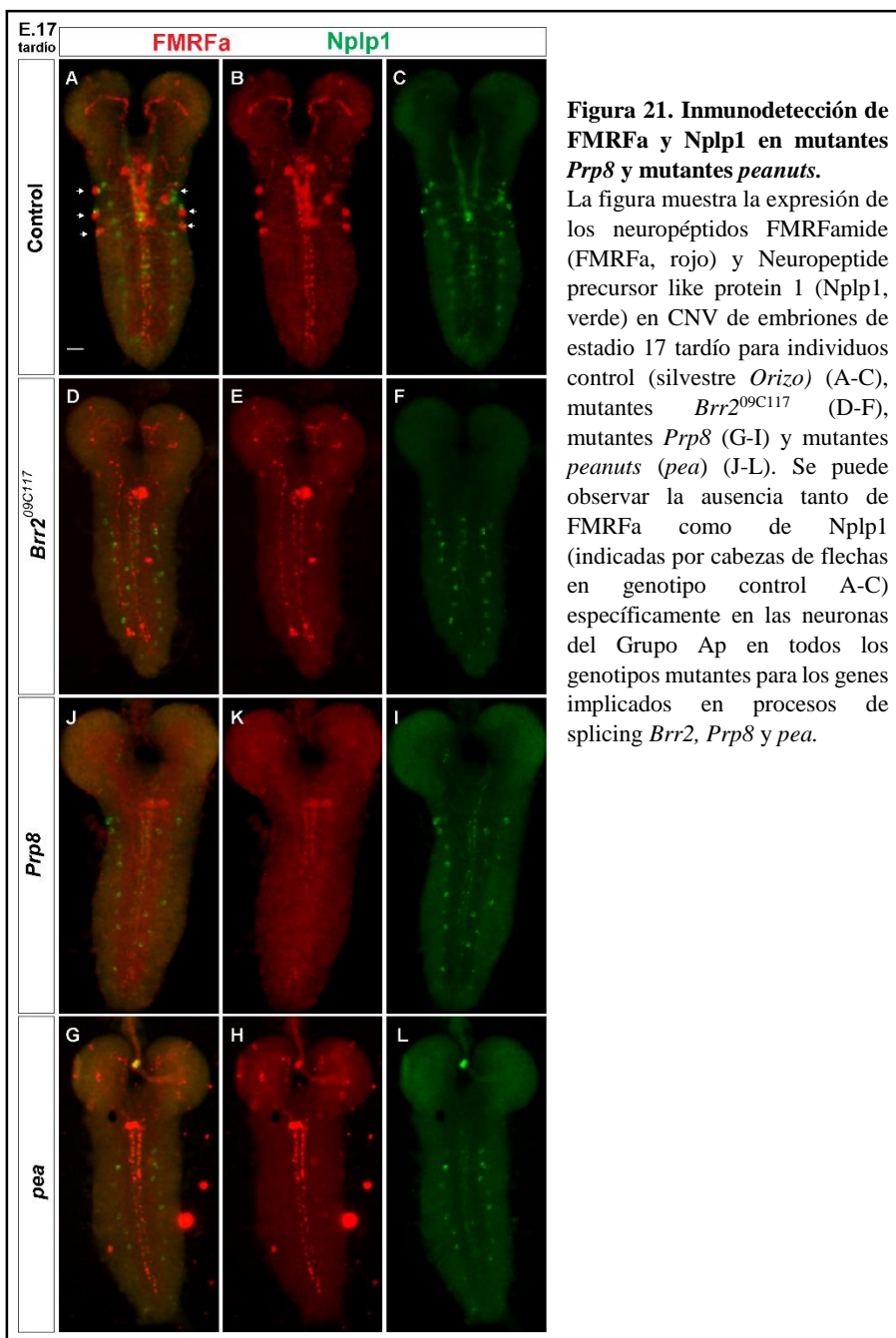
### **5. *Brr2* como componente del spliceosoma dentro de los mecanismos de diferenciación del grupo Ap**

Tal y como se ha descrito en la introducción, *Brr2* codifica una ribonucleoproteína que forma parte de la subunidad U5 del spliceosoma y resulta fundamental en la activación del pre-spliceosoma para promover el procesamiento del ARNm (Staley and Guthrie, 1998). En los resultados mostrados en esta tesis demostramos que *Brr2* juega un importante papel en la especificación neuronal del Grupo Apterous, tanto en la expresión del neuropéptido Nplp1, como en la axonación y activación de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$  necesaria para la expresión de FMRFa. En esta tesis se pretendió, no sólo determinar las relaciones epistáticas existentes entre *Brr2* y los componentes de la especificación neuronal, sino esclarecer la posible existencia de una regulación específica en cuanto a procesamiento de ARN en los mecanismos de adquisición de un determinado destino celular. Para ello se hizo necesario determinar si los fenotipos observados en los mutantes *Brr2* correspondían a defectos relacionados con la función de *Brr2* en los mecanismos de splicing o por el contrario, desempeña un papel independiente del splicing en la especificación neuronal. Como aproximación a esta cuestión se propusieron dos abordajes complementarios. Por un lado se realizó el estudio de la especificación neuronal del Grupo Apterous en otros mutantes que codifican genes relacionados con los mecanismos de splicing. Se estudiaron dos genes: *Prp8*, gen que codifica para una ribonucleoproteína también componente de la subunidad U5 del spliceosoma y reguladora de *Brr2* durante el procesamiento del ARN (Bottner et al., 2005; Grainger and Beggs, 2012; Maeder et al., 2009; Staley and Guthrie, 1998), y *peanuts* (*pea*), que codifica para una de las

proteínas encargadas del desensamblaje del spliceosoma (Fourmann et al., 2013). Por otro lado se estudiaron los ARNm de los genes *sax*, *tkv*, *wit* y *Nplp1* relacionados en la especificación del Grupo Apterous en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. Actualmente se está realizando en el laboratorio el estudio de otros genes relacionados con la especificación neuronal del grupo Apterous así como genes relacionados con los procesos de proyección axonal.

### **5.1 Identificación de *Prp8* y *peanuts* como determinantes de los destinos neuropeptidérgicos FMRFa y *Nplp1* en el Grupo Apterous**

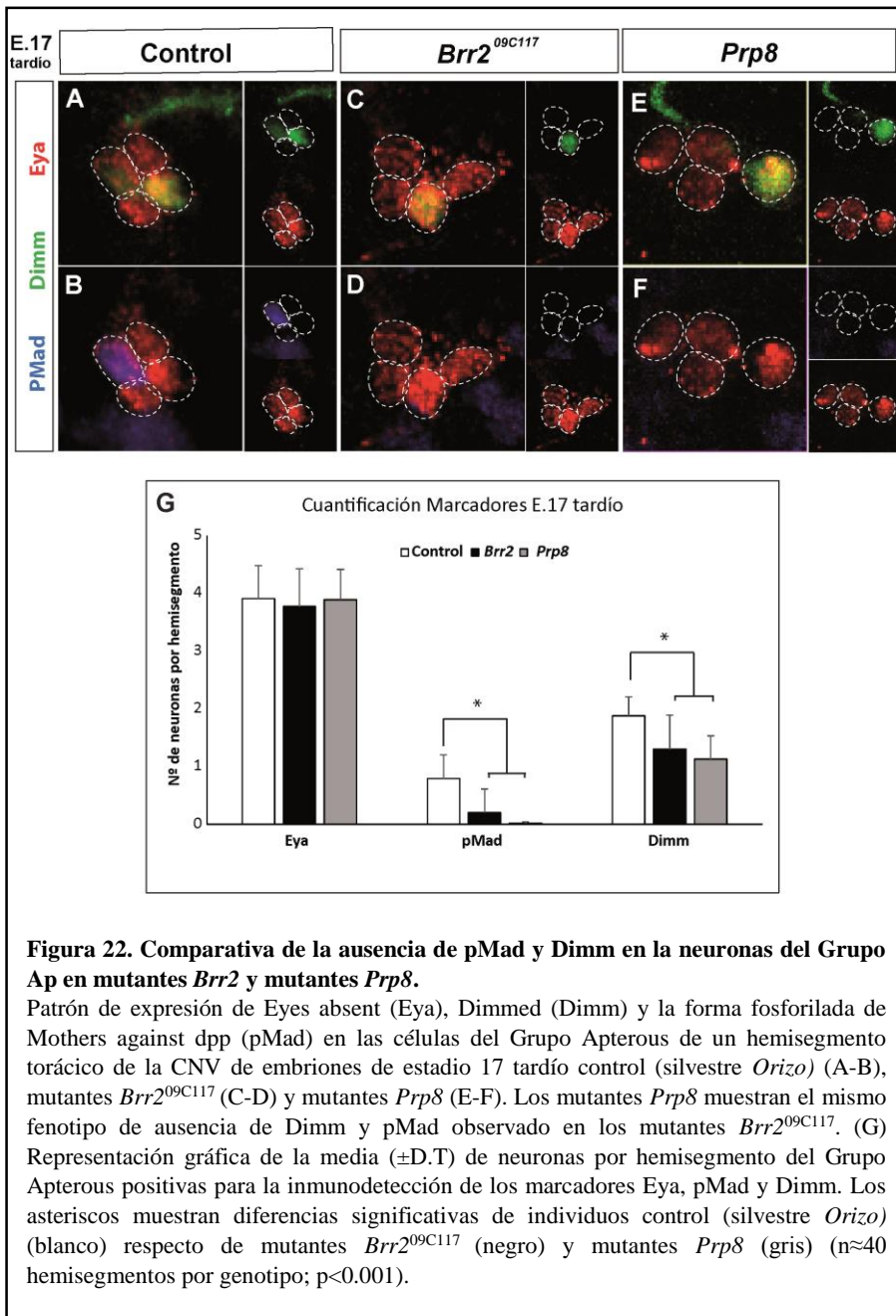
En la búsqueda selectiva de genes implicados en la especificación de la FMRFa realizada por el laboratorio de S. Thor, además de *Brr2*, se identificaron otros dos genes relacionados con mecanismos de splicing, *Prp8* y *pea*. Tanto *Prp8* como *pea* mostraron defectos en la especificación de este neuropéptido que, al igual que *Brr2*, están estrechamente relacionado con los mecanismos de splicing. Tal y como se ha descrito en la introducción, *Prp8*, además de formar parte del complejo U5, es un regulador de la actividad de *Brr2*. Se ha descrito en experimentos realizados *in vitro*, que en ausencia de *Prp8*, *Brr2* no es capaz de ejercer su actividad helicasa y por tanto no es capaz de liberar las subunidad U4/U6, proceso necesario para la activación del spliceosoma (Maeder et al., 2009). El gen *pea*, por medio de la hidrólisis de ATP, está encargado de la liberación del intrón en estructura de lazo del complejo C. El hecho de que mutantes *Brr2*, *Prp8* y *pea*, todos genes necesarios para una correcta realización del splicing, muestren fenotipo de defectos de especificación en FMRFa induce a pensar que son los defectos en el splicing y no otro tipo de interacciones génicas, los que generan la falta de neuropéptido en estos mutantes.



Con objeto de determinar si *Prp8* y *pea* mostraban el mismo fenotipo de defectos en especificación de los destinos celulares del Grupo Apterous, se realizó la inmunodetección y cuantificación de FMRFa y de Nplp1 en mutantes *Prp8* y en mutantes *pea* (Fig.21). Tanto los mutantes *Prp8* como los mutantes *pea*, mostraron la ausencia de FMRFa en Ap4, manteniendo la expresión en las células SE2. La cuantificación reveló una significativa reducción en la expresión de FMRFa respecto al genotipo silvestre, con resultados parecidos a los observados para los mutantes *Brr2*: sólo el 1,7 % de los hemisegmentos cuantificados en mutantes *Prp8* ( $n=57$ ,  $p<0,001$ ) y el 0% en mutantes *pea* ( $n=45$ ,  $p<0,001$ ) mostraban FMRFa en Ap4. La cuantificación de Nplp1 también reveló resultados similares en ambos mutantes a los observados en mutantes *Brr2*, significativa ausencia de Nplp1 en Ap1 pero no en las células correspondientes a las células dAp. En mutantes *Prp8*, el 0% de los hemisegmentos cuantificados mostraron Nplp1 en Ap1 ( $n=57$ ,  $p<0,001$ ), al igual que en mutantes *pea* (0%,  $n=45$ ,  $p<0,001$ ).

Adicionalmente se realizaron inmunodetecciones de los factores Eya, Dimm y pMad en mutantes *Prp8* con el objeto de comprobar si se comportaba como fenocopia de los mutantes *Brr2*. La cuantificación de pMad reveló la ausencia significativa de pMad en las células correspondientes al Grupo Apterous en mutantes *Prp8*, presente en tan sólo el 2,2% de los hemisegmentos estudiados ( $n=46$ ,  $p<0,001$ ) (Fig.22). La inmunodetección de Dimm también mostro la ausencia significativa de este marcador en una de las células del Grupo Ap, ya que tan sólo el 15,2 % ( $n=46$ ,  $p<0,001$ ) de los hemisegmentos mostraban las 2 células Dimm, siendo este fenotipo muy similar al observado en mutantes *Brr2*. No se encontraron diferencias significativas para la cuantificación de Eya ni respecto al control, ni respecto a los mutantes *Brr2*.

Estos resultados parecen indicar que los mutantes *Brr2*, *Prp8* y *pea* tienen fenotipos parecidos en cuanto a defectos de especificación en el Grupo Apterous. A pesar de que estos resultados no son determinantes, parece que todos estos genes participan de forma conjunta en la expresión de FMRFa y Nplp1 y, dado que todos ellos actúan en el procesamiento del ARN, sugieren que el defecto en el splicing de alguno de los factores que intervienen en la especificación del Grupo Apterous es el responsable de los fenotipos observados.



## 5.2 Estudio preliminar de los ARNm de los genes *sax*, *tkv*, *wit* y *Nplp1* en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>

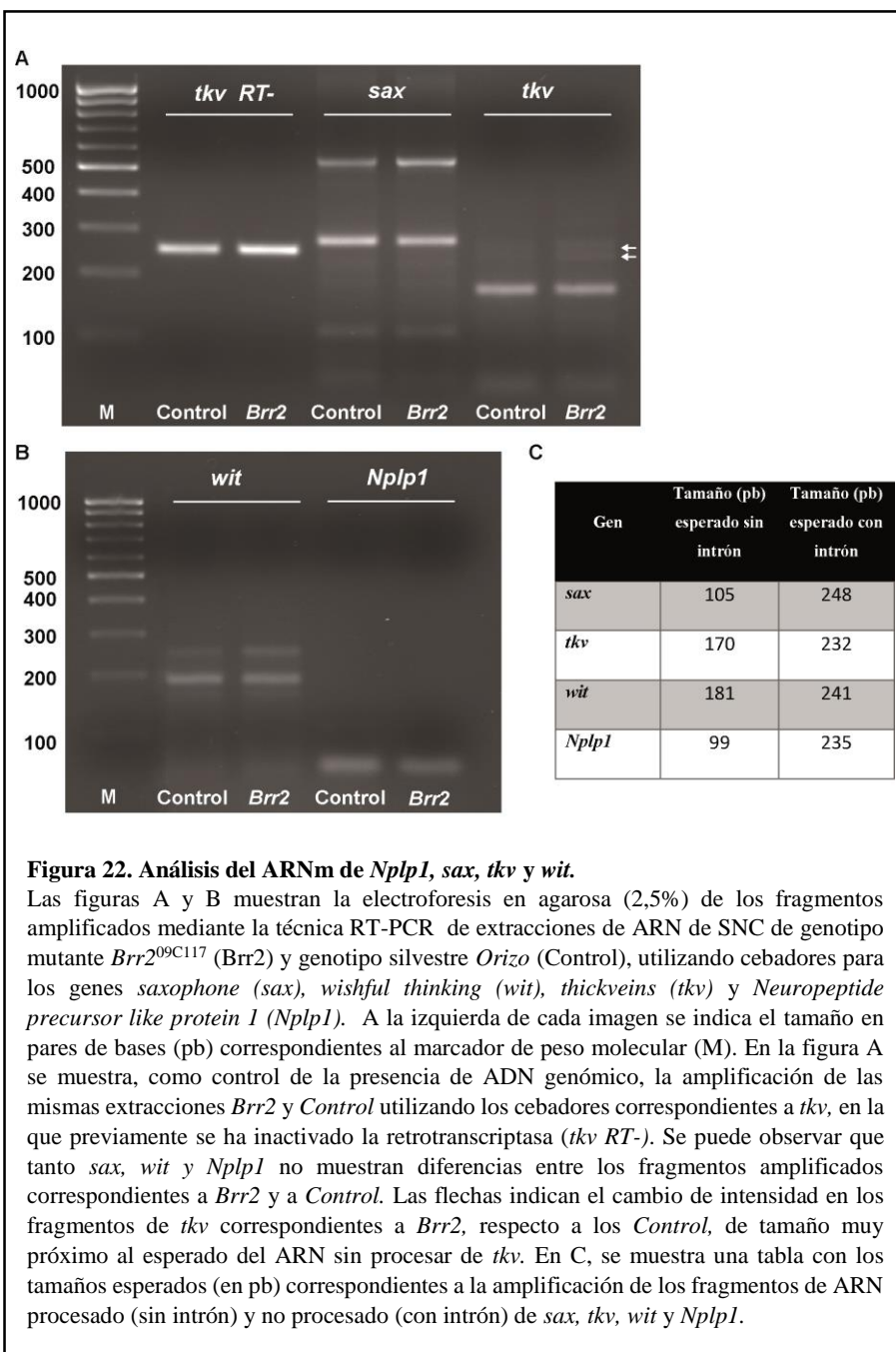
A la luz de los resultados obtenidos en los mutantes *Prp8* y en los mutantes *pea* descritos en el apartado anterior, y teniendo en cuenta la función desempeñada por *Brr2* en los procesos de splicing, nos propusimos identificar defectos de splicing en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. Para detectar estos posibles defectos en la eliminación de intrones de los ARNm, se estudiaron los transcritos de algunos de los genes relacionados con el código de especificación del Grupo Apterous. Este estudio se realizó mediante la retrotranscripción y amplificación de secuencias específicas de ARN (RT-PCR) correspondientes a los genes *sax*, *tkv*, *wit*, y *Nplp1* en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. Se diseñaron cebadores específicos, situados en exones contiguos, que amplificaran regiones que incluyeran intrones comunes a las posibles isoformas de cada uno de los genes mencionados. Mediante el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados, se pudo distinguir si determinada secuencia específica contenía la región intrónica, y por tanto amplificó un fragmento de mayor tamaño, o por el contrario el splicing sucedió normalmente y se eliminó la región intrónica, amplificando un fragmento de tamaño más pequeño. Se diseñaron cebadores correspondientes a los genes *sax*, *tkv*, *wit*, y *Nplp1*. Los tamaños esperados, tanto incluyendo la región intrónica, como en situación de correcto splicing, se detallan en la figura 22 (C). Se extrajo el ARN de SNC diseccionado de embriones de estadio 17 tardío correspondientes al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> y genotipo control (silvestre *Orizo*) y se realizó una amplificación mediante RT-PCR. Para controlar la posible presencia de ADN genómico, se procedió a inactivar la retrotranscriptasa tanto para la amplificación correspondiente al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> como para genotipo control. Los tamaños de los fragmentos resultantes de a RT-PCR se analizaron mediante electroforesis (Fig. 22).

El análisis de los tamaños de los fragmentos correspondientes al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> reveló la presencia de fragmentos del tamaño esperado para secuencias correctamente procesadas en todos los genes estudiados *sax*, *tkv*, *wit*, y *Nplp1*, que aparentemente no mostraban diferencias con los correspondientes al genotipo control. (Fig.22). Estos resultados demuestran que en mutantes *Brr2* se produce splicing de *sax*, *tkv*, *wit* y *Nplp1* en el SNC embrionario.

En el caso de *Nplp1* no se detectaron fragmentos correspondientes al tamaño sin procesar ni en la extracción correspondiente al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> ni en la correspondiente al genotipo control. Este resultado sugiere que el procesamiento de *Nplp1* no se encuentra afectado en mutantes *Brr2*.

En el caso de los fragmentos detectados para *sax* y *wit*, no se encontraron diferencias entre los fragmentos detectados correspondientes al genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> y a los detectados en la correspondiente al genotipo control. En el caso de *sax*, se detectaron fragmentos correspondientes a los tamaños esperados procesados y sin procesar, siendo éste último el mayoritario según su intensidad. Así mismo se detectaron otros fragmentos amplificados con los cebadores de *sax* que no correspondían con los esperados (mayores de 500pb), y que estaban presentes tanto en el genotipo mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> como en genotipo control (Figura 22). En el caso de *wit*, se detectaron fragmentos correspondientes a los tamaños esperados procesados y sin procesar, siendo la forma procesada la mayoritaria según su intensidad. Estos resultados sugieren que el procesamiento de *sax* y *wit* no se encuentra afectado en mutantes *Brr2*.

El análisis de los fragmentos amplificados correspondientes al gen *tkv* reveló diferencias en los fragmentos amplificados en los mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> respecto a los amplificados en el genotipo salvaje. Se detectaron dos fragmentos muy próximos al tamaño esperado para *tkv* no procesado, uno que migra a la misma altura que el fragmento genómico, y otro un poco menor. Estos fragmentos mostraron una intensidad mayor en el mutante *Brr2*<sup>09C117</sup> que los correspondientes en el genotipo control (Fig. 22 flechas). El mismo resultado se obtuvo en dos extracciones independientes. Debido a la detección de fragmentos amplificados en situación de inactivación de la retrotranscriptasa (Fig.22, *tkv RT*-), que indica la presencia de ADN genómico, no se puede asegurar que esta diferencia de intensidad se deba estrictamente a la presencia de ARN no procesado de *tkv*, especialmente teniendo en cuenta que la amplificación de genómico muestra intensidad mayor en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> que en genotipo control. No obstante, el fragmento detectado menor de 232pb, no detectado en el control *tkv RT*-, podría indicar que existen defectos en el procesamiento del ARNm de *tkv* en el SNC de individuos mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>. Sería necesario aislar y secuenciar estos fragmentos para determinar si esta afirmación es correcta.





Estos resultados confirman que el splicing de los genes *sax*, *tkv*, *wit* y *Nplp* se puede producir correctamente en los mutantes *Brr2* y sugieren que de haber una deficiencia en el splicing para estos genes, ésta no se da a nivel general sino que sería específica de grupos celulares concretos. De hecho, la extracción de ARN corresponde a todo el SNC y los defectos en splicing, de suceder en grupos celulares concretos, podrían no ser detectada en estos experimentos. Así mismo los defectos podrían darse a nivel de splicing alternativo, no reflejados en este experimento. Por lo tanto, aunque el análisis de los fragmentos amplificados para el gen *tkv* podría indicar que existe un defecto en el procesamiento del pre-mRNA del gen *tkv*, los resultados observados no resultan concluyentes. Si bien es cierto que hay diferencias de intensidad entre los fragmentos de tamaño correspondiente a no procesados entre mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup> y control, estas diferencias podrían deberse a otros factores como la presencia de ADN genómico en las muestras. A pesar de ello, la presencia más acusada de dos tipos de fragmentos en mutantes *Brr2*<sup>09C117</sup>, próximos al tamaño correspondiente a la forma que incluye la región intrónica, podrían ser indicativos, sino de un defecto en el procesamiento del ARN correspondiente a *tkv*, de una reducción en la eficiencia de este proceso.







## DISCUSIÓN

---

Los resultados observados en la presente tesis nos han permitido aproximarnos a esclarecer las hipótesis planteadas, y por tanto aportar nuevo conocimiento sobre los mecanismos por los cuales se produce especificación celular. En primer lugar se ha descrito la importancia de *Brr2* en los procesos de especificación neural en el Grupo Apterous para los marcadores de diferenciación terminal FMRFa y Nplp1. En el caso Ap4 y la expresión de FMRFa, los resultados obtenidos revelan que *Brr2* resulta crucial en dos puntos clave de los procesos de especificación: por un lado, es necesario para la correcta invasión de Ap4 al ONH y, por otro lado, resulta determinante en la activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /BMP. En el caso de Ap1 y Nplp1, se ha demostrado que *Brr2* es absolutamente necesario para la especificación de Ap1, aunque la ausencia de *Brr2* no parece afectar a ninguno de los componentes conocidos del código de especificación de Nplp1. Adicionalmente, los ensayos realizados en esta tesis, aunque no resultan determinantes, sí arrojan luz acerca de la importancia de la regulación post-transcripcional en los procesos de especificación del Grupo Apterous. El hecho de que mutaciones en genes tan relacionados con procesos de splicing como son *Brr2*, *Prp8*, y *peanuts*, muestren fenotipos idénticos en cuanto a la expresión de los marcadores terminales FMRFa y Nplp1 específicamente en el Grupo Apterous, sugieren que una minuciosa regulación post-transcripcional actúa en conjunción con los códigos combinatorios reguladores de la transcripción. Estos resultados, obtenidos en un sistema del que se conocen tantos elementos implicados en su diferenciación como es el NB 5-6T, abren una nueva puerta y amplían las posibilidades de estudio de la implicación de los mecanismos de splicing en la diferenciación neuronal.

### **1. *Brr2* en la especificación del Grupo Apterous.**

Hasta el momento, *Brr2* había sido descrito como componente esencial del spliceosoma jugando un papel determinante en el procesamiento del ARN (Herold et al., 2009; Staley and Guthrie, 1998). Del mismo modo en *Drosophila* se han realizado estudios de búsqueda selectiva de genes relacionados con splicing y splicing alternativo donde se ha confirmado la implicación de *Brr2* en estos procesos (Park et al., 2004). Los resultados observados en esta tesis proponen un nuevo enfoque respecto a la función de *Brr2* enmarcándolo en la especificación neuronal. Los resultados observados en mutantes *Brr2* nos han permitido afirmar que *Brr2* resulta crucial para la correcta expresión de los marcadores de diferenciación terminal FMRFa y Nplp1 específicamente en las neuronas del grupo Apterous, Ap4 y Ap1 respectivamente, y no en otras neuronas donde también se expresan. El estudio de los factores temporales, así como al código combinatorio que éstos desencadenan específicamente en el Grupo Apterous, han permitido esclarecer, a la vez que plantear, nuevas cuestiones respecto al papel de *Brr2* en los procesos de especificación neural.

El estudio de los genes temporales *cas* y *grh* durante el estadio 16, momento muy temprano en el que las neuronas del Grupo Ap han nacido y comienzan a diferenciarse, no reveló diferencias entre los individuos mutantes *Brr2* y los individuos control. Estos resultados permiten afirmar que en este sistema, *Brr2* no tiene efecto en la progresión de los factores temporales, y sugieren que el NB progresa normalmente hasta el nacimiento de las neuronas del Grupo Ap. Así mismo, no se encontraron diferencias en la expresión de los genes *col*, *sqz* ni *nab* en dicho estadio 16, permitiendo afirmar que la triple cascada de señalización activada por Cas se inicia correctamente, predeterminando la identidad de las células del

Grupo Ap tal y como describen estudios anteriores (Baumgardt et al., 2007, 2009).

### **1.1 Papel de *Brr2* en la especificación de Ap1 y la expresión de Nplp1 en el Grupo Apterous**

En cuanto a los marcadores correspondientes al código combinatorio correspondientes a estadio 17 tardío, no se encontraron diferencias en relación a los determinantes del destino Ap1. Según los resultados obtenidos en esta tesis, tanto Col, Eya, como Dimm se expresan correctamente en Ap1 y por tanto *Brr2* no parece regular estos factores. En el caso de la expresión del gen *ap*, cabe destacar que se visualizó mediante la expresión del reportero GFP mediante el sistema Gal4-UAS, dado que no fue posible tener acceso a un anticuerpo que posibilitara la inmunodetección de la proteína Ap. Teniendo en cuenta la implicación de *Brr2* en el proceso de splicing, proceso de naturaleza post-transcripcional, habría que contemplar la posibilidad de que a pesar de que la región reguladora de *ap* esté activa, el procesamiento del transcrito de *ap* no fuese correcto, dando lugar a una proteína defectuosa, lo cual podría explicar la ausencia de Nplp1 tal como se describe trabajos previos (Baumgardt et al., 2007). En realidad, este planteamiento es extensivo a todos los marcadores utilizados dado que, la inmunodetección de las distintas proteínas no garantiza que éstas sean funcionales. No obstante se ha descrito que la falta de Ap también tiene asociada la ausencia de expresión de *dim* en Ap1 (Allan et al., 2005). Dado que nuestros resultados revelan la presencia de Dimm en Ap1, y junto con el hecho de que resultados previos obtenidos en el mismo trabajo (Allan et al., 2005) describen una correcta especificación de la neurona Ap1 en mutantes *ap* mediante la expresión dirigida de *dim* al Grupo Ap, la posible ausencia de Ap no parece ser la responsable del fenotipo de falta de Nplp1 observado en mutantes *Brr2*. A

pesar del esfuerzo realizado, las observaciones realizadas en esta tesis no permiten concretar la función específica de *Brr2* en la expresión de *Nplp1* y por tanto, en la especificación de *Ap1*. Lo que sí podemos afirmar es que *Brr2* no podría actuar directamente activando la expresión de *Nplp1*, dado que no posee dominios de unión a ADN parecidos a otros factores de transcripción (HLH, dedos de Zinc, o cierre de Leucina), y, aunque no determinantes, nuestros resultados del análisis por RT-PCR tampoco parecen indicar que actúe directamente en el splicing de *Nplp1*.

Recientes estudios, orientados a determinar la red de interacción proteica en *Drosophila* mediante inmunoprecipitación, han descrito la posibilidad de interacción física entre *Brr2* y *Eya* (Guruharsha et al., 2011). Deficiencias en posibles mecanismos regulados por esta interacción podrían ser los responsables del fenotipo de ausencia de *Nplp1* observado, dado que los mutantes *eya* muestran ausencia de *Nplp1*, tanto en *Ap1* como en las neuronas dAp (Baumgardt et al., 2007). No obstante, los mutantes *Brr2* no muestran defectos en la expresión de *Nplp1* en dAp, lo que induce a pensar que defectos en esta posible interacción, aún no esclarecida en cuanto a función, no son los responsables de la falta de *Nplp1*, aunque no podemos descartar que esta interacción con *Eya* sólo sea necesaria en la especificación de *Ap1* y no en dAp.

Probablemente, *Brr2* esté implicado en la especificación de *Ap1*, ya sea a nivel de procesamiento o regulación, en otros procesos aún desconocidos como integración de señales extrínsecas, en componentes del código de especificación aún no descritos, o en mecanismos relacionados con el procesamiento de neuropéptidos. Se necesitarán conocer más componentes de la especificación de esta neurona para poder arrojar luz sobre el papel que tiene *Brr2* en la especificación de la misma.



## 1.2 Papel de *Brr2* en la especificación de Ap4 y la expresión de FMRFa en el Grupo Apterous

En cuanto a los marcadores correspondientes al código combinatorio correspondientes a estadio 17 tardío en Ap4, se encontraron diferencias en dos de ellos. Por un lado la total ausencia de pMad, que indica defectos en la vía de señalización retrógrada TGF- $\beta$ /BMP, y por otro la ausencia frecuente de Dimm ( $\approx 57\%$ ). Estos resultados muestran que existe una relación entre *Brr2* y los componentes del código de especificación de Ap4.

Dimm es un factor de transcripción común a todas las neuronas neuropeptidérgicas y ha sido descrito como regulador de genes correspondientes a enzimas implicadas en biosíntesis de neuropeptidos como *Furin 1* y *Pal2* (*Peptidil- $\alpha$ -hidroxiglicina- $\alpha$ -amidante liasa 2*) (Park et al., 2004). A pesar de ser un factor determinante en el procesamiento de neuropeptidos, estudios previos han descrito que individuos mutantes *dim* no muestran ausencia de FMRFa en Ap4, aunque sí ven disminuido su nivel de expresión (Allan et al., 2005). Este hecho, junto con la frecuencia de ausencia de FMRFa, en torno a un 96%, que no correlaciona con la frecuencia de ausencia de Dimm, en torno al 57%, sugiere que la falta de FMRFa en Ap4 en mutantes *Brr2* no es debida a defectos en la expresión o procesamiento de *dim*. Sin embargo, *Brr2* sí parece estar implicado en la regulación de la expresión o el procesamiento de *dim* como demuestra el fenotipo de ausencia parcial. Dos de los reguladores directos de la expresión de *dim* son los factores de transcripción codificados por los genes *syp*, que actúa como inhibidor específicamente en Ap2 y Ap3 (Benito-Sipos et al., 2011), y *ap*, que actúa como activador

de la expresión de *dimm*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no mostraron diferencias en la expresión de *svp* en individuos mutantes *Brr2* respecto los individuos control. Por tanto, *svp* no parece ser el responsable de la ausencia de Dimm en Ap4. Respecto al gen *ap*, ha sido descrito como regulador de la transcripción de *dimm* (Allan et al., 2005) y como se comentó previamente, aunque se pudo comprobar que la transcripción de *ap* está activa, no se ha podido realizar inmunodetección de Ap. De nuevo atendiendo al fenotipo observado en estudios anteriores, individuos mutantes *ap* muestran ausencia de expresión de *dimm* en Ap1 y en dAp en toda la CNV, así como en Ap4 en el segmento torácico T1 pero no en los segmentos torácicos T2-T3 (Allan et al., 2005). En los resultados presentados en esta tesis, individuos mutantes *Brr2* no muestran pérdida de Dimm en Ap1 ni existe diferencia significativa entre los segmentos T1, T2 y T3 en la pérdida de Dimm. Del mismo modo, no observamos pérdida alguna ni de Nplp1 ni de Dimm en las células dAp (Mostrado solo para LP1 en la Fig.14). Todas estas afirmaciones inducen a descartar alteraciones en la proteína Ap como responsables del fenotipo de ausencia de Dimm observado en mutantes *Brr2*.

Mad es un factor de transcripción, y tal y como se describe en la introducción, su forma fosforilada (pMad) es un indicador de la activación de la vía de señalización retrógrada TGF- $\beta$ /BMP en Ap4 (Allan et al., 2003; Marqués et al., 2003). Aunque es posible que el defecto en la expresión de Mad, y no de su fosforilación, sea la responsable de la ausencia de inmunodetección de pMad, los experimentos realizados de inmunodetección en estadio 17 tardío han mostrado que pMad sí se encuentra presente en otras células no pertenecientes al Grupo Ap. Por otro lado, si hubiera un defecto de expresión específico de Mad en Ap4, no se hubiera observado rescate de FMRFa en los experimentos de expresión de

formas permanentemente activas de los receptores BMP tipo I (Sax<sup>A</sup> y Tkv<sup>A</sup>), que obligan a fosforilar a Mad siempre y cuando éste esté presente en los mutantes *Brr2* (Allan et al., 2003; Keshishian and Kim, 2004). Adicionalmente, la ausencia de fosforilación de Mad en mutantes *Brr2* se ve justificada por los resultados presentados en esta tesis que han podido identificar que la activación de la ruta de señalización TGF- $\beta$ /BMP en Ap4 se ve limitada en estos mutantes por dos factores independientes entre sí, salvo el nexo de unión de que ambos parecen depender de *Brr2*: un defecto en los procesos de proyección axonal al ONH y la ausencia de activación del heterotetrámero formado por los receptores de tipo BMP.

En relación a los procesos de proyección axonal, los resultados muestran de forma inequívoca que no hay invasión al ONH por parte de Ap4 en mutantes *Brr2*. Este resultado explica por si solo la falta de FMRFa en Ap4, al verse imposibilitada la activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /BMP por falta de su ligando Gbb, que tal y como se ha descrito en estudios previos resulta necesario para la expresión de FMRFa (Allan et al., 2003; Marqués et al., 2003). La morfología de la axonación de las neuronas Ap4 al ONH ha sido descrita en detalle en estudios anteriores (Santos et al., 2007). Las neuronas Ap4 proyectan hacia la línea media para luego tomar una orientación dorsal terminando en una arborización ligada a la invasión del ONH, de donde reciben el ligando Gbb. La resolución de la metodología empleada en los experimentos realizados para estudiar la axonación permite afirmar que los individuos mutantes *Brr2* carecen de la arborización característica de la invasión al ONH y parece sugerir una correcta proyección hacia la línea media. No obstante, este resultado debería confirmarse usando la región reguladora específica de Ap4, distinta de *FMRFa-Gal4* debido a que en mutantes *Brr2* como hemos podido comprobar no está activa, en lugar de la región reguladora *ap-Gal4*.

De esta forma se evitaría la posible confusión con la proyección de las otras neuronas del Grupo Ap, aun no descritas, que pudieran enmascarar la deficiencia en la proyección hacia la línea media de Ap4.

El papel específico de *Brr2* en los procesos de axonación no se ha podido esclarecer mediante los ensayos realizados en esta tesis. Eya ha sido descrito como necesario para los procesos de axonación de Ap4, (Miguel-Aliaga et al., 2004), y tal y como se ha descrito antes existe la una posible interacción proteína-proteína entre Eya y Brr2 (Guruharsha et al., 2011). Esta interacción podría ser necesaria para la correcta proyección axonal específicamente de Ap4. En este sentido, se han realizado ensayos preliminares en mutantes transheterocigotos *Brr2/eya* con objeto de dilucidar si esta posible interacción podría ser la responsable de los defectos de axonación y falta de FMRFa (datos no mostrados). Los resultados no revelaron diferencias en la inmunodetección de FMRFa respecto a los individuos silvestres, no obstante, al estar ambos alelos en heterocigosis estos resultados no resultan concluyentes y sería necesario profundizar en este aspecto. Por otro lado, *Brr2* ha sido descrito como factor de splicing alternativo específico de gen *lola*, que mediante splicing alternativo genera al menos 19 factores de transcripción distintos implicados en guía de la proyección axonal (Crown et al., 2002; Goeke et al., 2003). Se han realizado ensayos preliminares en nuestro laboratorio en mutantes *lola* intentando determinar si presentan defectos en la expresión de FMRFa, no encontrando diferencias en cuanto su inmunodetección (datos no mostrados). No obstante, los resultados tampoco resultaron concluyentes debido a la imposibilidad de replicar los fenotipos de defectos de axonación previamente descritos para mutantes de *lola* con los alelos disponibles en nuestro laboratorio. De nuevo, resulta

necesario profundizar en este análisis con objeto de dilucidar la relación de *Brr2* en los procesos de proyección axonal.

En relación a la activación del heterotetrámero formado por los receptores de tipo BMP, los experimentos planteados en esta tesis mostraron la importancia de *Brr2* en la activación de dichos receptores en la vía de señalización TGF- $\beta$ /BMP en Ap4. Teniendo en cuenta la falta de axonación observada, cabría esperar un rescate del fenotipo de falta de FMRFa en Ap4 en los experimentos de expresión dirigida con UAS-*gbb*, de tal modo que la expresión de *gbb* en Ap4 “puentea” la invasión al ONH. Según se ha podido comprobar en estudios anteriores, la expresión dirigida de *gbb* a Ap4 resulta en el rescate prácticamente completo de FMRFa en individuos con defectos en la proyección axonal (Allan et al., 2003). No obstante, no se observó rescate de FMRFa, ni expresión de pMad en Ap4, en individuos mutantes *Brr2* que expresaban *gbb* en Ap4. Por tanto, *Brr2*, además de en la correcta invasión del ONH, está alterando otro elemento de la vía de señalización TGF- $\beta$ /BMP. Teniendo en cuenta que los receptores BMP fosforilan directamente a Mad (Kretzschmar et al., 1997), y que tal y como se ha comentado antes, no existen indicios de que haya defectos de expresión o procesamiento de *Mad*, debido al rescate parcial de FMRFa observado en los experimentos de expresión dirigida de la forma activa de los receptores BMP tipo I Sax<sup>A</sup> y Tkv<sup>A</sup>, probablemente *Brr2* actuaría a nivel de expresión y/o procesamiento de los receptores BMP o de la formación del heterotetrámero. Desafortunadamente, este experimento no nos permite identificar si *Brr2* actúa sobre los receptores BMP tipo I (Sax, Tkv) o sobre los receptores BMP tipo II (Wit), dado que estudios previos han descrito que el fenotipo de pérdida de FMRFa observado en mutantes *wit* es rescatado mediante la expresión de las formas constitutivamente activas

Sax<sup>A</sup> y Tkv<sup>A</sup> (Allan et al., 2003). No obstante, observando los resultados preliminares del análisis por RT-PCR del ARNm de *wit*, *sax* y *tkv*, parece ser que defectos en el procesamiento de *tkv* son los responsables del fenotipo de FMRFa. Estos resultados deben ser aún afianzados para lo que resulta determinante realizar una inmunodetección de Tkv a fin de comprobar un defecto de procesamiento específicamente en *tkv* y que éste se da específicamente en Ap4. Además, con el objeto de comprobar que el fenotipo no es debido a defectos en la expresión o procesamiento de *wit*, habría que dirigir, en fondo mutante *Brr2*, la expresión de las formas normales, no constitutivamente activas, de *sax* y *tkv* junto con la expresión de *gbb*, en los cuales cabría esperar un fenotipo similar al observado con *sax<sup>A</sup>* y *tkv<sup>A</sup>*. Además, cabe destacar que el fenotipo de rescate de FMRFa en Ap4 mediante expresión conjunta de *sax<sup>A</sup>* y *tkv<sup>A</sup>* en mutantes *Brr2* es, aunque significativo, más bajo (≈30%) que el observado en estudios previos de rescate en mutantes *wit* (89%) (Allan et al., 2003). La eficiencia del rescate podría verse afectada por la frecuente falta de Dimm observada en mutantes *Brr2*, aunque mutantes *dimm* no muestran ausencia de FMRFa, sino una disminución en sus niveles de expresión (Allan et al., 2005). Por otro lado, estudios previos han descrito que la activación de los efectores de la vía BMP son dosis-dependiente de los receptores BMP tipo I, actuando como autorreguladores, de tal forma que la expresión dirigida de éstos mediante el sistema *Gal4>UAS* podría resultar en fenotipos de dominante negativo (Haerry et al., 1998). Diferencias en la región reguladora *Gal4* y en la temperatura, dado que la efectividad del sistema *Gal4>UAS* es sensible a temperatura (Brand and Perrimon, 1993), podrían explicar las diferencias observadas con respecto a experimentos previos en la eficiencia del rescate de FMRFa en mutantes *Brr2*.

## **2. *Brr2* como regulador post-trancricional en la especificación neuronal**

Los resultados expuestos en esta tesis muestran que *Brr2* juega un papel fundamental en la especificación de los destinos celulares del Grupo Ap, aunque los mecanismos a través de los cuales realiza su función no han podido ser identificados de forma inequívoca. Si bien es cierto que hasta el momento *Brr2* ha sido descrito como regulador de los procesos de splicing, la posibilidad de interaccionar físicamente con proteínas como Eya, tan ligadas a la especificación del Grupo Ap, plantea la posibilidad de que *Brr2* pueda estar actuando en otros procesos además de en el procesamiento del ARNm.

Tal y como se ha mencionado previamente, la posible interacción entre Eya y *Brr2* podría estar detrás, tanto de la ausencia de expresión de *Nplp1* en Ap1, como de los defectos de axonación en Ap4. Si bien es cierto que el fenotipo observado en estudios previos en mutantes *eya* para la expresión de *Nplp1* no se corresponde con el fenotipo observado en mutantes *Brr2* en las neuronas dAp (donde no se encuentra defecto alguno, a diferencia de mutantes *eya*), sí se corresponde con la ausencia de *Nplp1* en Ap1 (Allan et al., 2005). Así mismo, los experimentos preliminares realizados en mutantes transheterocigotos *Brr2/eya* no pudieron identificar ningún efecto en la expresión de FMRFa, pero no resultan determinantes en cuanto a la posibilidad de interacción entre ambos en los procesos de diferenciación neuronal.

Por otro lado, el estudio de expresión de FMRFa y *Nplp1* en mutantes de otros genes implicados en splicing realizados en esta tesis, como *pea* y *Prp8*, muestran un fenotipo idéntico al observado en mutantes *Brr2*. Habiendo sido descritos los tres genes *Brr2*, *pea* y *Prp8* como determinantes para la correcta progresión de los procesos de splicing,

resulta lógico pensar que defectos en el mecanismo de splicing son responsables de los defectos observados en la especificación, más que otro tipo de mecanismos aún no descritos para estos genes. Cabe destacar que Prp8 forma parte del complejo U5 del spliceosoma junto con Brr2, que ambos interactúan físicamente y que Prp8 actúa como regulador directo tanto de la actividad helicasa como de la actividad ATPasa de *Brr2* (Maeder et al., 2009; Small et al., 2006). Por tanto no es de extrañar que los mutantes *Prp8* se comporten como fenocopias de los mutantes *Brr2*, tal y como se ha podido observar en los resultados de la inmunodetección de FMRFa, Nplp1, Dimm y pMad. Del mismo modo, la regulación ejercida por Prp8 ha sido descrita en cuanto a procesos de splicing, y al correcto desensamblaje del complejo U4/U6, y Prp8 forma parte integral del spliceosoma (Staley and Guthrie, 1998), de tal forma que parece improbable que Prp8 regule además a Brr2 en otros procesos distintos del splicing. No obstante, Prp8 podría interactuar físicamente con Ap según ha sido descrito en el mismo estudio realizado para identificar interacciones proteicas en *Drosophila* (Guruharsha et al., 2011). De nuevo, la naturaleza de la función de esta interacción no ha sido descrita, de tal forma que defectos en esta interacción podrían ser la causa de los fenotipos observados en mutantes Prp8. Sin embargo, hay que recordar que los mutantes *ap* muestran una ausencia total de Dimm, tanto en Ap1 como en Ap4 (Allan et al., 2005), y dicho fenotipo no se ha observado en mutantes *Prp8*, según muestran los resultados expuestos en esta tesis. Todos estos indicios sugieren que los defectos en los mecanismos de splicing son los responsables de los fenotipos observados.

Los resultados preliminares del estudio de los ARNm por RT-PCR, aunque no concluyentes, parecen mostrar un defecto en el procesamiento del pre-ARN de *tkv* en mutantes *Brr2*. Respecto a los resultados obtenidos en este



análisis, cabe destacar que aun observando la presencia de ADN genómico, tanto en la extracción de mutantes *Brr2* como en la correspondiente a individuos control que podría enmascarar el resultado, la ausencia de diferencias en las muestras correspondientes a los otros genes analizados (*Nplp1*, *wit* y *sax*) parecen indicar, sino que existe un defecto de procesamiento de *tkv* en mutantes *Brr2*, al menos que éste es más acusado. De poder confirmar este resultado se podría afirmar que el defecto en la activación de la ruta de señalización TGF- $\beta$ /BMP en Ap4 está determinado por defectos en el procesamiento de splicing y no en otro tipo de procesos en los que pueda estar implicado *Brr2*. Del mismo modo, esperaríamos encontrar el mismo resultado para el análisis de ARNm en mutantes *Prp8*, observando los mismos defectos en el procesamiento del pre-ARN de *tkv*.

Existe la posibilidad de que tanto la interacción de Brr2-Eya como la interacción Prp8-Ap, estén estrechamente relacionadas con la regulación del procesamiento post-transcripcional o el reclutamiento del spliceosoma además de actuar como reguladores de transcripción. La integración de ambos procesos, regulación transcripcional y splicing, ya ha sido descrita en *Drosophila* y mamíferos en la especificación de fibras musculares por factores de transcripción pertenecientes a la familia Mef2 en *Drosophila* y sus homólogos en mamíferos (Spletter and Schnorrer, 2014). Estudios en levaduras han descrito que determinados factores promueven el ensamblaje del spliceosoma, concretamente el factor Sub2 promueve el acoplamiento de Brr2 a transcritos que contienen intrones (Moore et al., 2006). Así mismo, aunque los procesos de splicing pueden darse de forma estrictamente post-transcripcional, la asociación entre transcripción y splicing es un proceso frecuente que aumenta la eficiencia de la expresión y el procesamiento de genes (Das et al., 2006; Kornblihtt et al., 2004). Debido a los pocos datos al respecto obtenidos en esta tesis no se puede

profundizar más en este sentido, no obstante merece la pena reflexionar sobre ello y sobre la posibilidad de aprovechar las ventajas que ofrece el modelo de especificación del Grupo Ap en el estudio de la relación entre procesos transcripcional y post-transcripcionales.

### **3. *Brr2* en la especificación neuronal: factor específico en diferenciación frente a componente general del spliceosoma.**

Si bien los experimentos realizados no han permitido afirmar si es debido a un defecto en los mecanismos de splicing o a defectos en otros procesos aún no descritos para *Brr2* sí han permitido afirmar de forma inequívoca, que por medio de unos u otros, *Brr2* resulta determinante para la correcta expresión de los marcadores terminales FMRFa y Nplp1. Además, nos ha permitido afirmar que *Brr2* resulta crucial para la expresión de estos marcadores específicamente en las neuronas del grupo Apterous (Ap1 y Ap4), no así en otros grupos celulares que expresan Nplp1 (células dAp) o FMRFa (células SE2). A pesar de haber sido descrita la expresión de *Brr2* como ubicua (Berkeley *Drosophila* Genome Project, Tomancak et al., 2002) y de ser un componente básico del spliceosoma (Herold et al., 2009), resulta improbable que los defectos observados en la expresión de FMRFa y Nplp1 en el Grupo Ap sean debidos a un defecto generalizado del splicing, puesto que afectarían a la presencia de estos neuropéptidos en otros grupos celulares. Resulta más plausible que *Brr2* juegue un papel localizado en el Grupo Apterous, así como posiblemente en otros grupos determinados de células, adquiriendo un papel “activo” en la especificación de un determinado destino celular. En este sentido convendría estudiar la expresión de otros marcadores de diferenciación terminal como los neuropéptidos Capability (Capa) o Leucoquinina (Lk),

a fin de intentar identificar si la función de *Brr2* es específica de la diferenciación del Grupo Ap o puede darse en otros grupos celulares.

Puesto que *Brr2* es esencial para el procesamiento del ARNm, surge la cuestión de cómo pueden ser tan específicos los defectos de procesamiento de ARN en mutantes *Brr2*, o en otras palabras, ¿cómo pueden el resto de genes estudiados en el Grupo Ap y en el resto del embrión realizar un correcto splicing? Se ha descrito en estudios *in vitro* que la proteína Prp24 puede promover la disociación del complejo U4/U6, incluso se ha podido observar que esta disociación puede ocurrir en ausencia del ensamblaje de U4/U6 con la subunidad U5 (Raghubathan and Guthrie, 1998; Staley and Guthrie, 1998). Por tanto los defectos observados en mutantes *Brr2* podrían estar relacionados con alteraciones en la eficiencia de los mecanismos de splicing, más que con la ausencia de splicing en sí. También hay que destacar que, según el estudio de expresión de *Brr2* (Berkeley *Drosophila* Genome Project, Tomancak et al., 2002), podría tener efecto materno (aunque sólo descrito hasta el estadio 3), de modo que los mutantes analizados podrían ser en realidad hipomorfos. Sería necesario realizar un estudio exhaustivo de la expresión de *Brr2*, preferentemente mediante inmunodetección a fin de esclarecer si *Brr2* podría estar presente en estadios tardíos y de ser así comprobar sus niveles de expresión. A pesar del posible efecto materno, nuestros resultados no dejan duda que el efecto observado en mutantes *Brr2* no es un defecto generalizado en el splicing sino que es específico al menos para el Grupo Ap.

Los defectos observados en mutantes *Brr2* parecen estar relacionados con defectos en el splicing, tal y como sugieren los fenotipos idénticos observados en mutantes *Prp8* y *pea*, ambos también genes muy relacionados con procesos de splicing. No obstante, cómo los procesos de

splicing, y en concreto Brr2, Prp8 y Pea, en principio factores generales en el ciclo de splicing, pueden estar tan específicamente restringidos en un grupo celular concreto no está del todo claro. Un estudio realizado acerca de la retinosis pigmentaria, enfermedad relacionada con mutaciones en el homólogo *Brr2p*, proponen algunos modelos de cómo defectos en el procesamiento del pre-ARN pueden generar defectos específicos en fotorreceptores (Mordes et al., 2006). El primero, modelo de haploinsuficiencia, en el que se propone que la disminución en la presencia componentes de splicing genera defectos en aquellos grupos celulares con una alta demanda de expresión de ARNm y síntesis de proteínas. El segundo, muy relacionado con el primero, sugiere la presencia de co-factores específicos que activen o recluten el spliceosoma, actuando como factor limitante en la tasa de procesamiento de ARN. El tercero, propone que la expresión de formas mutantes de factores de splicing actúen como dominantes negativos, reflejando defectos de splicing y por tanto defectos o patologías en grupos celulares más susceptibles o menos resistentes. Los resultados observados en esta tesis no permiten esclarecer si uno u otro de estos modelos es más plausible. No obstante, de nuevo la interacción tanto de Brr2, como de Prp8 con los factores Eya y Ap respectivamente induce a considerar la interacción entre factores de transcripción y procesamiento de pre-ARN. Tal y como se ha descrito anteriormente, la transcripción y el procesamiento del ARNm están estrechamente relacionados entre sí, y diversos estudios realizados en este sentido, confirman que el reclutamiento, ensamblaje y la presencia de ARNm procesado puede depender de los factores reguladores de transcripción así como de la interacción entre ambos procesos (Bentley, 2005; Kornblihtt et al., 2004; de la Mata et al., 2011). No obstante, aún no se ha podido determinar los mecanismos específicos que rigen esta interacción.

Los defectos específicos observados en la especificación del Grupo Ap en mutantes *Brr2*, junto con la posible interacción de factores de transcripción pertenecientes al código de especificación de los destinos celulares de este grupo con Brr2 y su regulador directo Prp8, parecen sugerir una asociación de los procesos transcripcionales y post-transcripcionales orientada a la adquisición de un determinado destino celular. De nuevo el modelo de especificación del Grupo Ap ofrece un marco complejo pero definido en el que poder profundizar en la interacción entre estos procesos y arrojar luz sobre los posibles mecanismos específicos, tan pobremente conocidos, que rigen esta interacción.









## CONCLUSIONES

---

1. La proteína componente del spliceosoma Brr2 es necesaria para la correcta especificación neuronal en la CNV de *Drosophila melanogaster*.
2. Brr2 es necesario para la expresión de los marcadores de diferenciación terminal FMRFamida y Neuropeptide like precursor 1 específicamente en las neuronas Ap1 y Ap4, respectivamente, del Grupo Apterous, no así en otros grupos celulares que expresan dichos neuropéptidos en la CNV.
3. La expresión de los componentes conocidos del código combinatorio necesario para la especificación de las neuronas Ap1 no se ve afectada por Brr2.
4. Brr2 no altera la expresión de ninguno de los reguladores conocidos de *Dimmed*, no obstante sí modula la expresión de *Dimmed* específicamente en la neurona Ap4 del Grupo Apterous.
5. Brr2 es necesario para establecer la correcta proyección axonal de Ap4 al órgano neurohemal.
6. Brr2 es necesario para la expresión y/o activación de los receptores BMP de la ruta de señalización BMP/TGF- $\beta$  en la neurona Ap4 de Grupo Apterous.
7. Se requiere la correcta expresión de los factores de splicing Brr2, Prp8 y Peanuts para la especificación neuronal de Ap1 y Ap4 en el grupo Apterous.







## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abdelhaleem, M. (2005). RNA helicases: regulators of differentiation. *Clinical Biochemistry* 38, 499–503.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101, 1–22.
- Allan, D.W., Pierre, S.E.S., Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2003). Specification of Neuropeptide Cell Identity by the Integration of Retrograde BMP Signaling and a Combinatorial Transcription Factor Code. *Cell* 113 73–86.
- Allan, D.W., Park, D., St. Pierre, S.E., Taghert, P.H., and Thor, S. (2005). Regulators Acting in Combinatorial Codes Also Act Independently in Single Differentiating Neurons. *Neuron* 45, 689–700.
- Barolo, S., Carver, L.A., and Posakony, J.W. (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *BioTechniques* 29, 726–732.
- Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H., and Thor, S. (2007). Specification of Neuronal Identities by Feedforward Combinatorial Coding. *PLoS Biol* 5(2):e37.
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Díaz-Benjumea, F.J., and Thor, S. (2009). Neuronal Subtype Specification within a Lineage by Opposing Temporal Feed-Forward Loops. *Cell* 139, 969–982.
- Benito-Sipos, J., Estacio-Gómez, A., Moris-Sanz, M., Baumgardt, M., Thor, S., and Díaz-Benjumea, F.J. (2010). A genetic cascade involving

klumpfuss, nab and castor specifies the abdominal leucokinergetic neurons in the *Drosophila* CNS. *Development* *137*, 3327–3336.

Benito-Sipos, J., Ulvklo, C., Gabilondo, H., Baumgardt, M., Angel, A., Torroja, L., and Thor, S. (2011). Seven up acts as a temporal factor during two different stages of neuroblast 5-6 development. *Development* *138*, 5311–5320.

Bentley, D.L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Current Opinion in Cell Biology* *17*, 251–256.

Bhat, K.M. (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *BioEssays* *21*, 472–485.

Bork, P., and Koonin, E.V. (1993). An expanding family of helicases within the “DEAD/H” superfamily. *Nucleic Acids Res.* *21*, 751–752.

Bottner, C.A., Schmidt, H., Vogel, S., Michele, M., and Käufer, N.F. (2005). Multiple genetic and biochemical interactions of Br2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* *48* (3), 151–161.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401–415.

Brizuela, B.J., Elfring, L., Ballard, J., Tamkun, J.W., and Kennison, J.A. (1994). Genetic analysis of the brahma gene of *Drosophila melanogaster* and polytene chromosome subdivisions 72AB. *Genetics* *137*, 803–813.

Budirahardja, Y., and Gönczy, P. (2009). Coupling the cell cycle to Development. *Development* *136*, 2861–2872.

Cau, E., and Blader, P. (2009). Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Development* 4, 36.

Chia, W., and Yang, X. (2002). Asymmetric division of *Drosophila* neural progenitors. *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 459–464.

Cleary, M.D., and Doe, C.Q. (2006). Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window. *Genes Dev.* 20, 429–434.

Crowner, D., Madden, K., Goeke, S., and Giniger, E. (2002). Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development* 129, 1317–1325.

Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M., and Reed, R. (2006). Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. *Genes Dev.* 20, 1100–1109.

DiAntonio, A., Haghighi, A.P., Portman, S.L., Lee, J.D., Amaranto, A.M., and Goodman, C.S. (2001). Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function. *Nature* 412, 449–452.

Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855–863.

Doe, C.Q., and Bowerman, B. (2001). Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 68–75.

Doe, C.Q., and Technau, G.M. (1993). Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS. *Trends Neurosci.* 16, 510–514.

Dredge, B.K., Polydorides, A.D., and Darnell, R.B. (2001). The splice of life: Alternative splicing and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 2, 43–50.

- Edlund, T., and Jessell, T.M. (1999). Progression from Extrinsic to Intrinsic Signaling in Cell Fate Specification: A View from the Nervous System. *Cell* 96, 211–224.
- Fourmann, J.-B., Schmitzová, J., Christian, H., Urlaub, H., Ficner, R., Boon, K.-L., Fabrizio, P., and Lührmann, R. (2013). Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system. *Genes Dev.* 27, 413–428.
- Gabilondo, H., Losada-Pérez, M., del Saz, D., Molina, I., León, Y., Canal, I., Torroja, L., and Benito-Sipos, J. (2011). A targeted genetic screen identifies crucial players in the specification of the *Drosophila* abdominal Capaergic neurons. *MOD* 208–221.
- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Goeke, S., Greene, E.A., Grant, P.K., Gates, M.A., Crowner, D., Aigaki, T., and Giniger, E. (2003). Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 6, 917–924.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17, 4713–4730.
- Grabowski, P.J., and Black, D.L. (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 65, 289–308.
- Grainger, R.J., and Beggs, J.D. (2012). Prp8 Protein: At the Heart of the Spliceosome. *RNA* 11, 533–557.



Guruharsha, K.G., Rual, J.-F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., et al. (2011). A Protein Complex Network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 147, 690–703.

Haerry, T.E., Khalsa, O., O'Connor, M.B., and Wharton, K.A. (1998). Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in *Drosophila*. *Development* 125, 3977–3987.

Hahn, D., and Beggs, J.D. (2010). Brr2p RNA helicase with a split personality: insights into structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1105–1109.

Herold, N., Will, C.L., Wolf, E., Kastner, B., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2009). Conservation of the Protein Composition and Electron Microscopy Structure of *Drosophila melanogaster* and Human Spliceosomal Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 29, 281–301.

Hippenmeyer, S., Kramer, I., and Arber, S. (2004). Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies. *Trends in Neurosciences* 27, 482–488.

Hirth, F., Hartmann, B., and Reichert, H. (1998). Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125, 1579–1589.

Jermy, A.J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B.M., and Stirling, C.J. (2006). The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J. Biol. Chem.* 281, 7899–7906.

Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S.J., and Odenwald, W.F. (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev.* 12, 246–260.

Karcavich, R., and Doe, C.Q. (2005). *Drosophila* neuroblast 7-3 cell lineage: A model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity. *The Journal of Comparative Neurology* 481, 240–251.

Keshishian, H., and Kim, Y.-S. (2004). Orchestrating development and function: retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends in Neurosciences* 27, 143–147.

Kohwi, M., and Doe, C.Q. (2009). Stem Cell Transcriptional Loops Generate Precise Temporal Identity. *Cell Stem Cell* 5, 577–578.

Kornblihtt, A.R., Mata, M.D.L., Fededa, J.P., Muñoz, M.J., and Nogués, G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10, 1489–1498.

Koushika, S.P., Lisbin, M.J., and White, K. (1996). ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. *Current Biology* 6, 1634–1641.

Koushika, S.P., Soller, M., and White, K. (2000). The Neuron-Enriched Splicing Pattern of *Drosophila* erect wing Is Dependent on the Presence of ELAV Protein. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1836–1845.

Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J., and Massagué, J. (1997). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 11, 984–995.

Lawrence, P.A., Sanson, B., and Vincent, J.P. (1996). Compartments, wingless and engrailed: patterning the ventral epidermis of *Drosophila* embryos. *Development* 122, 4095–4103.

Lopez, A.J. (1998). ALTERNATIVE SPLICING OF PRE-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. *Annual Review of Genetics* 32, 279–305.

- Losada-Pérez, M., Gabilondo, H., del Saz, D., Baumgardt, M., Molina, I., León, Y., Monedero, I., Díaz-Benjumea, F., Torroja, L., and Benito-Sipos, J. (2010). Lineage-unrelated neurons generated in different temporal windows and expressing different combinatorial codes can converge in the activation of the same terminal differentiation gene. *Mechanisms of Development* *127*, 458–471.
- Maeder, C., Kutach, A.K., and Guthrie, C. (2009). ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nature Structural & Molecular Biology* *16*, 42–48.
- Marqués, G., Haerry, T.E., Crotty, M.L., Xue, M., Zhang, B., and O'Connor, M.B. (2003). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor Wishful Thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. 5457–5470.
- De la Mata, M., Munoz, M.J., Allo, M., Fededa, J.P., Schor, I.E., and Kornblihtt, A.R. (2011). RNA Polymerase II Elongation at the Crossroads of Transcription and Alternative Splicing. *Genet Res Int* *2011*.
- Maurange, C., Cheng, L., and Gould, A.P. (2008). Temporal Transcription Factors and Their Targets Schedule the End of Neural Proliferation in *Drosophila*. *Cell* *133*, 891–902.
- McDonald, J.A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C.Q., and Mellerick, D.M. (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the vnd homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev.* *12*, 3603–3612.
- Miguel-Aliaga, I., Allan, D.W., and Thor, S. (2004). Independent Roles of the Dachshund and Eyes Absent Genes in BMP Signaling, Axon Pathfinding and Neuronal Specification. *Development* *131*, 5837–5848.
- Moore, M.J., Schwartzfarb, E.M., Silver, P.A., and Yu, M.C. (2006). Differential Recruitment of the Splicing Machinery during Transcription

Predicts Genome-Wide Patterns of mRNA Splicing. *Molecular Cell* 24, 903–915.

Mordes, D., Luo, X., Kar, A., Kuo, D., Xu, L., Fushimi, K., Yu, G., Sternberg, P., and Wu, J.Y. (2006). Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 12, 1259–1271.

Mozaffari-Jovin, S., Wandersleben, T., Santos, K.F., Will, C.L., Lührmann, R., and Wahl, M.C. (2013). Inhibition of RNA helicase Brr2 by the C-terminal tail of the spliceosomal protein Prp8. *Science* 341 (6141), 80–84.

Muotri, A.R., and Gage, F.H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* 441, 1087–1093.

O’Keefe, D.D., Thor, S., and Thomas, J.B. (1998). Function and specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system and wing. *Development* 125, 3915–3923.

Park, J.W., Parisky, K., Celotto, A.M., Reenan, R.A., and Graveley, B.R. (2004). Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *PNAS* 101, 15974–15979.

Pearson, B.J., and Doe, C.Q. (2004). Specification of Temporal Identity in the Developing Nervous System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 619–647.

Raghunathan, P.L., and Guthrie, C. (1998). A Spliceosomal Recycling Factor That Reanneals U4 and U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles. *Science* 279, 857–860.

Reichert, H. (2009). Evolutionary conservation of mechanisms for neural regionalization, proliferation and interconnection in brain development. *Biol. Lett.* 5, 112–116.

Robinow, S., Campos, A.R., Yao, K.M., and White, K. (1988). The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science* *242*, 1570–1572.

Salomonis, N., Schlieve, C.R., Pereira, L., Wahlquist, C., Colas, A., Zambon, A.C., Vranizan, K., Spindler, M.J., Pico, A.R., Cline, M.S., et al. (2010). Alternative splicing regulates mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PNAS* *107*, 10514–10519.

Salz, H.K., and Erickson, J.W. (2010). Sex determination in *Drosophila*: The view from the top. *Fly (Austin)* *4*, 60–70.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1987). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.

Santos, J.G., Vömel, M., Struck, R., Homberg, U., Nässel, D.R., and Wegener, C. (2007). Neuroarchitecture of Peptidergic Systems in the Larval Ventral Ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* *2*(8), e695.

Schneider, L.E., and Taghert, P.H. (1990). Organization and expression of the *Drosophila* Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> neuropeptide gene. *J. Biol. Chem.* *265*, 6890–6895.

Schneider, L.E., Roberts, M.S., and Taghert, P.H. (1993). Cell type-specific transcriptional regulation of the *Drosophila* FMRFamide neuropeptide gene. *Neuron* *10*, 279–291.

Skeath, J.B. (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *BioEssays* *21*, 922–931.

Skeath, J.B., and Thor, S. (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Current Opinion in Neurobiology* *13*, 8–15.

- Small, E.C., Leggett, S.R., Winans, A.A., and Staley, J.P. (2006). The EF-G-like GTPase Snu114p Regulates Spliceosome Dynamics Mediated by Brr2p, a DExD/H Box ATPase. 389–399.
- Spletter, M.L., and Schnorrer, F. (2014). Transcriptional regulation and alternative splicing cooperate in muscle fiber-type specification in flies and mammals. *Experimental Cell Research* 321, 90–98.
- Staley, J.P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs, and Things. *Cell* 92, 315–326.
- Taghert, P.H. (1999). FMRFamide neuropeptides and neuropeptide-associated enzymes in *Drosophila*. *Microsc. Res. Tech.* 45, 80–95.
- Technau, G.M., Berger, C., and Urbach, R. (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Developmental Dynamics* 235, 861–869.
- Terriente Felix, J., Magariños, M., and Díaz-Benjumea, F.J. (2007). Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development* 134, 1845–1852.
- Thor, S. (2013). Neuroscience: Stem cells in multiple time zones. *Nature* 498, 441–443.
- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S.E., et al. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol.* 3, research0088-0088.14
- Tran, K.D., and Doe, C.Q. (2008). Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development* 135, 3491–3499.
- Tsuji, T., Hasegawa, E., and Isshiki, T. (2008). Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development* 135, 3859–3869.

- Ulvklo, C., MacDonald, R., Bivik, C., Baumgardt, M., Karlsson, D., and Thor, S. (2012). Control of neuronal cell fate and number by integration of distinct daughter cell proliferation modes with temporal progression. *Development* 139, 678–689.
- Urbach, R., and Technau, G.M. (2000). Dorsoventral Patterning of the Brain: A Comparative Approach. *Adv.Exp.Med.Biol.*628, 42-56
- Venables, J.P., Tazi, J., and Juge, F. (2012). Regulated functional alternative splicing in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* 40, 1–10.
- Wang, H., and Chia, W. (2005). *Drosophila* neural progenitor polarity and asymmetric division. *Biology of the Cell* 97, 63–74.
- Will, C.L., and Lührmann, R. (2011). Spliceosome Structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003707
- Woodley, L., and Valcárcel, J. (2002). Regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 1, 266–277.
- Zhao, C., Bellur, D.L., Lu, S., Zhao, F., Grassi, M.A., Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Daiger, S.P., Chen, L.J., Pang, C.P., et al. (2009). Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa Caused by a Mutation in SNRNP200, a Gene Required for Unwinding of U4/U6 snRNAs. *The American Journal of Human Genetics* 85, 617–627.